



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0100056
 (43) 공개일자 2013년09월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07D 405/14 (2006.01) *C07D 413/14* (2006.01)
A61K 31/4196 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2012-7029781
 (22) 출원일자(국제) 2011년04월13일
 심사청구일자 없음
 (85) 번역문제출일자 2012년11월14일
 (86) 국제출원번호 PCT/EP2011/055840
 (87) 국제공개번호 WO 2011/128381
 국제공개일자 2011년10월20일
 (30) 우선권주장
 61/324,651 2010년04월15일 미국(US)

(71) 출원인
노파르티스 아게
 스위스 체하-4056 바젤 리히트스트라체 35
 (72) 발명자
에이브람스, 티냐
 미국 94608-2916 캘리포니아주 에머리빌 호튼 스트리트 4560 노바티스 백신즈 앤드 다이어그노스틱스 인크.
발산티, 폴, 에이.
 미국 94608-2916 캘리포니아주 에머리빌 호튼 스트리트 4560 노바티스 백신즈 앤드 다이어그노스틱스 인크.
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
위혜숙, 양영준

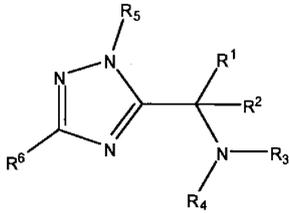
전체 청구항 수 : 총 37 항

(54) 발명의 명칭 **K S P 억제제로서의 트리아졸 화합물**

(57) 요약

본 발명은 본원에 추가로 기재된 하기 화학식 I의 트리아졸 화합물을 제공한다.

<화학식 I>



또한, 본 발명은 치료 유효량의 화학식 I의 화합물을 포함하는 제약 조성물, 및 KSP에 의해 적어도 부분적으로 매개되는 장애의 치료를 필요로 하는 포유류 환자에게 치료 유효량의 화학식 I의 화합물을 투여하는 것을 포함하는, 상기 포유류 환자에서의 KSP에 의해 적어도 부분적으로 매개되는 장애의 치료 방법을 제공한다.

(72) 발명자

당, 유

미국 94608-2916 캘리포니아주 에머리빌 호튼 스트리트 4560 노바티스 백신즈 앤드 다이어그노스틱스 인크.

델, 데이비드

미국 94608-2916 캘리포니아주 에머리빌 호튼 스트리트 4560 노바티스 백신즈 앤드 다이어그노스틱스 인크.

한, 우석

미국 94608-2916 캘리포니아주 에머리빌 호튼 스트리트 4560 노바티스 백신즈 앤드 다이어그노스틱스 인크.

후, 칭

미국 94608-2916 캘리포니아주 에머리빌 호튼 스트리트 4560 노바티스 백신즈 앤드 다이어그노스틱스 인크.

판, 웨

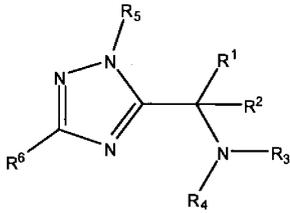
미국 94608-2916 캘리포니아주 에머리빌 호튼 스트리트 4560 노바티스 백신즈 앤드 다이어그노스틱스 인크.

특허청구의 범위

청구항 1

하기 화학식 I의 화합물.

<화학식 I>



상기 식에서,

R¹은 C₁₋₆ 알콕시-C₁₋₄-알킬, C₁₋₆ 직쇄 알킬, C₃₋₆ 분지형 알킬 및 -C₃₋₆ 시클로 알킬로부터 선택되고;

R²는 H 및 C₁₋₆ 직쇄 알킬로부터 선택되고;

R³은 -(CH₂)₀₋₃ 치환되거나 비치환된 피롤리디닐을 나타내고;

R⁴는 -C(O)-CH₂OH, -C(O)-테트라히드로푸라닐, -C(O)-CH(CH₃)-OH, -C(O)-비치환된 모르폴리닐 및 3개 이하의 알킬 기로 치환된 -C(O)-모르폴리닐로부터 선택되고;

R⁵는 치환되거나 비치환된 벤질로부터 선택되며, 여기서 치환체는 Cl, F, Br 및 I로부터 선택되고;

R⁶은 3개 이하의 할로젠 원자로 치환된 페닐로부터 선택된다.

청구항 2

제1항에 있어서, R¹이 C₁₋₆ 직쇄 알킬, C₃₋₆ 분지형 알킬 및 -C₃₋₆ 시클로 알킬로부터 선택된 것인 화합물.

청구항 3

제1항에 있어서, R¹이 C₁₋₆ 알콕시-C₁₋₄-알킬인 화합물.

청구항 4

제1항에 있어서,

R¹이 C₃₋₆ 분지형 알킬로부터 선택되고;

R²가 H를 나타내고;

R³이 -(CH₂)₁₋₃-치환된 피롤리디닐을 나타내고;

R⁴가 -C(O)-테트라히드로푸라닐, -C(O)-CH(CH₃)-OH, 3개 이하의 알킬 기로 치환된 -C(O)-모르폴리닐로부터 선택되고;

R⁵가 벤질 또는 2개 이하의 플루오로 원자로 치환된 벤질을 나타내고;

R⁶이 2개 이하의 할로젠 원자로 치환된 페닐로부터 선택된 것인 화합물.

청구항 5

제2항에 있어서,

R¹이 t-부틸을 나타내고;

R³이 -(CH₂)-플루오로-피롤리디닐을 나타내고;

R⁴가 -C(O)-테트라히드로푸라닐, -C(O)-CH(CH₃)-OH, -C(O)-2,6-디메틸 모르폴리닐로부터 선택되고;

R⁵가 벤질 또는 하나의 플루오로 원자로 치환된 벤질을 나타내고;

R⁶이 2개 이하의 플루오로 원자로 치환된 페닐로부터 선택된 것인 화합물.

청구항 6

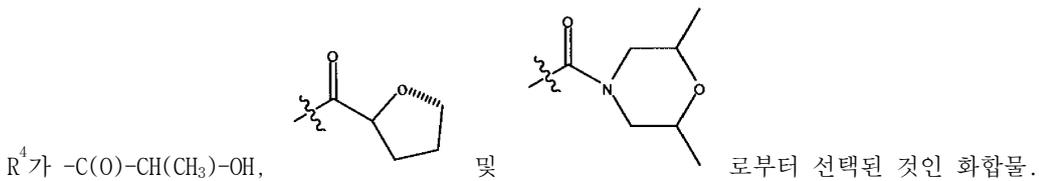
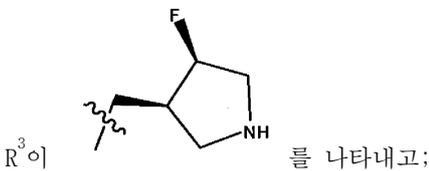
제4항 또는 제5항에 있어서,

R³이 -CH₂₋₃-플루오로-피롤리디닐을 나타내고;

R⁴가 -C(O)-2-테트라히드로푸라닐, -C(O)-CH(CH₃)-OH, -C(O)-2,6-디메틸 모르폴리닐을 나타내는 것인 화합물.

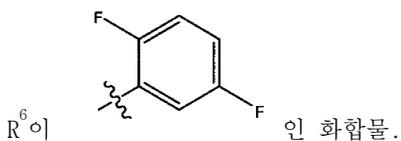
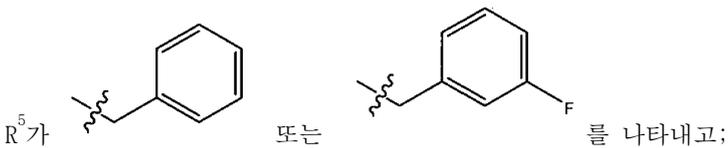
청구항 7

제6항에 있어서,



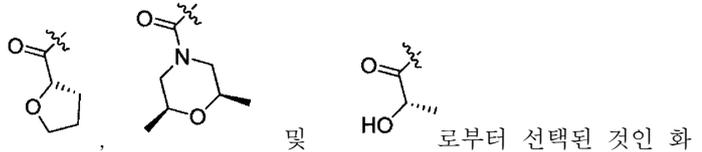
청구항 8

제7항에 있어서,



청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, R⁴가



청구항 10

제1항에 있어서,

N-((R)-1-(3-(2,5-디플루오로페닐)-1H-1,2,4-트리아졸-5-일)-2,2-디메틸프로필)-N-(((3R,4R)-4-플루오로피롤리딘-3-일)메틸)-2,6-디메틸모르폴린-4-카르복사미드;

N-((R)-1-(1-벤질-3-(2,5-디플루오로페닐)-1H-1,2,4-트리아졸-5-일)-2,2-디메틸프로필)-N-(((3R,4R)-4-플루오로피롤리딘-3-일)메틸)-2,6-디메틸모르폴린-4-카르복사미드;

(S)-N-((R)-1-(1-벤질-3-(2,5-디플루오로페닐)-1H-1,2,4-트리아졸-5-일)-2,2-디메틸프로필)-N-(((3R,4R)-4-플루오로피롤리딘-3-일)메틸)테트라히드로푸란-2-카르복사미드;

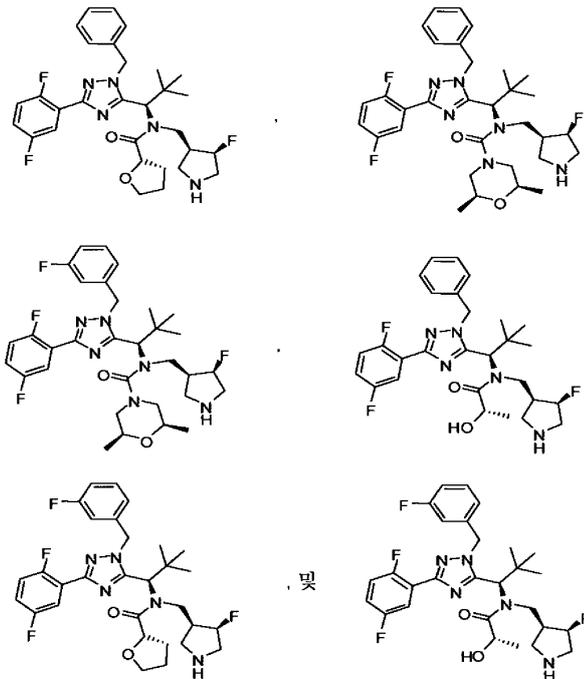
(S)-N-((R)-1-(3-(2,5-디플루오로페닐)-1-(3-플루오로벤질)-1H-1,2,4-트리아졸-5-일)-2,2-디메틸프로필)-N-(((3R,4R)-4-플루오로피롤리딘-3-일)메틸)테트라히드로푸란-2-카르복사미드;

(S)-N-((R)-1-(3-(2,5-디플루오로페닐)-1-(3-플루오로벤질)-1H-1,2,4-트리아졸-5-일)-2,2-디메틸프로필)-N-(((3R,4R)-4-플루오로피롤리딘-3-일)메틸)-2-히드록시프로판아미드; 및

(S)-N-((R)-1-(1-벤질-3-(2,5-디플루오로페닐)-1H-1,2,4-트리아졸-5-일)-2,2-디메틸프로필)-N-(((3R,4R)-4-플루오로피롤리딘-3-일)메틸)-2-히드록시프로판아미드;

및 임의의 이들 화합물의 제약상 허용되는 염으로부터 선택된 화합물.

청구항 11

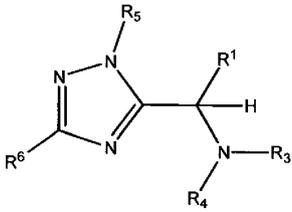


및 이들 화합물의 제약상 허용되는 염으로부터 선택된 화학식 I의 화합물 .

청구항 12

화학식 II의 화합물.

<화학식 II>



상기 식에서,

R¹은 C₁₋₆ 알콕시-C₁₋₄-알킬, C₁₋₆ 직쇄 알킬, C₃₋₆ 분지형 알킬 및 -C₃₋₆ 시클로 알킬로부터 선택되고;

R³은 -(CH₂)₀₋₃-치환되거나 비치환된 피롤리디닐, 또는 아미노 및 할로로부터 선택된 3개 이하의 기로 치환된 C₃₋₅ 알킬을 나타내고;

R⁴는 -C(O)-CH₂OH, -C(O)-테트라히드로푸라닐, -C(O)-CH(CH₃)-OH, -C(O)-비치환된 모르폴리닐 및 3개 이하의 알킬 기로 치환된 -C(O)-모르폴리닐로부터 선택되고;

R⁵는 치환되거나 비치환된 벤질로부터 선택되며, 여기서 치환체는 Cl, F, Br 및 I로부터 선택되고;

R⁶은 3개 이하의 할로겐 원자로 치환된 페닐로부터 선택된다.

청구항 13

제12항에 있어서,

R¹이 C₁₋₆ 알콕시-C₁₋₄-알킬, C₃₋₆ 분지형 알킬 및 C₃₋₆ 시클로 알킬로부터 선택되고;

R³이 -(CH₂)₀₋₃-치환된 피롤리디닐 또는 -CH₂-CH₂-CH(NH₂)-CH₂F를 나타내고;

R⁴가 -C(O)-CH₂OH, -C(O)-테트라히드로푸라닐, -C(O)-CH(CH₃)-OH, -C(O)-비치환된 모르폴리닐 및 3개 이하의 알킬 기로 치환된 -C(O)-모르폴리닐로부터 선택되고;

R⁵가 치환되거나 비치환된 벤질로부터 선택되며, 여기서 치환체는 Cl, F, Br 및 I로부터 선택되고;

R⁶이 3개 이하의 할로겐 원자로 치환된 페닐로부터 선택된 것인 화합물.

청구항 14

제12항 또는 제13항에 있어서, R¹이 메톡시-치환된 C₁₋₄ 알킬인 화합물.

청구항 15

제14항에 있어서, R¹이 2-메톡시-2-프로필인 화합물.

청구항 16

제12항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서,

R²가 H를 나타내고;

R³이 -(CH₂)₁₋₃-치환된 피롤리디닐 또는 -CH₂-CH₂-CH(NH₂)-CH₂F를 나타내고;

R⁴가 -C(O)-테트라히드로푸라닐, -C(O)-CH(CH₃)-OH 및 3개 이하의 알킬 기로 치환된 -C(O)-모르폴리닐로부터 선

택되고;

R⁵가 벤질 또는 2개 이하의 플루오로 원자로 치환된 벤질을 나타내고;

R⁶이 2개 이하의 할로젠 원자로 치환된 페닐로부터 선택된 것인 화합물.

청구항 17

제16항에 있어서,

R¹이 2-메톡시-2-프로필을 나타내고;

R³이 -(CH₂)_n-플루오로-피롤리디닐 또는 -CH₂-CH₂-CH(NH₂)-CH₂F를 나타내고;

R⁴가 -C(O)-테트라히드로푸라닐, -C(O)-CH(CH₃)-OH 및 -C(O)-2,6-디메틸 모르폴리닐로부터 선택되고;

R⁵가 벤질 또는 하나의 플루오로 원자로 치환된 벤질을 나타내고;

R⁶이 2개 이하의 플루오로 원자로 치환된 페닐로부터 선택된 것인 화합물.

청구항 18

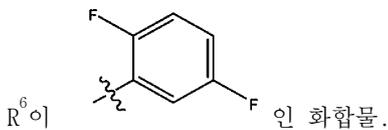
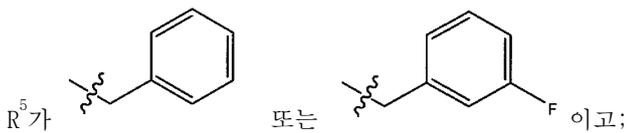
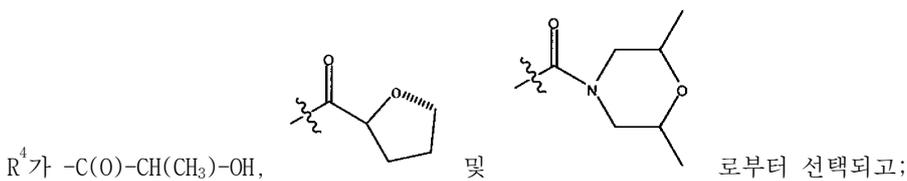
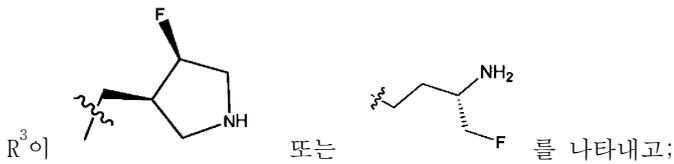
제17항에 있어서,

R³이 -(CH₂)₁₋₃-플루오로-피롤리디닐 또는 -CH₂-CH₂-CH(NH₂)-CH₂F를 나타내고;

R⁴가 -C(O)-2-테트라히드로푸라닐, -C(O)-CH(CH₃)-OH 및 -C(O)-2,6-디메틸 모르폴리닐을 나타내는 것인 화합물.

청구항 19

제18항에 있어서,



청구항 20

로포스파미드, 빈카 알칼로이드(vinca alkaloid), 안트라사이클린, 리톡시맙 및 트라스투주맙으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 조성물.

청구항 25

KSP에 의해 적어도 부분적으로 매개되는 장애의 치료를 필요로 하는 포유류 환자에게 치료 유효량의 제1항 내지 제21항 중 어느 한 항의 화합물 또는 제22항 내지 제24항 중 어느 한 항의 제약 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 상기 포유류 환자에서 KSP에 의해 적어도 부분적으로 매개되는 장애를 치료하는 방법.

청구항 26

제25항에 있어서, 장애가 세포 증식성 질환인 방법.

청구항 27

제26항에 있어서, 세포 증식성 질환이 암인 방법.

청구항 28

제27항에 있어서, 암이 폐암 및 기관지암; 전립선암; 유방암; 췌장암; 결장암 및 직장암; 갑상선암; 위암; 간암 및 간내담관암; 신장암 및 신우암; 방광암; 자궁체부암; 자궁경부암; 난소암; 다발성 골수종; 식도암; 급성 골수양 백혈병; 만성 골수양 백혈병; 림프구성 백혈병; 골수양 백혈병; 뇌암; 구강암 및 인두암; 후두암; 소장암; 비-호지킨(non-Hodgkin) 림프종; 흑색종; 및 결장 용모 선종으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

청구항 29

제28항에 있어서, 암의 치료를 위한 추가의 작용제가 이리노테칸, 토포테칸, 켈시타빈, 이마티닙, 트라스투주맙, 5-플루오로우라실, 류코보린, 카보플라틴, 시스플라틴, 도세탁셀, 파클리탁셀, 테자시타빈, 시클로포스파미드, 빈카 알칼로이드, 안트라사이클린, 리톡시맙 및 트라스투주맙으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

청구항 30

유효한 KSP-억제량의 제1항 내지 제21항 중 어느 한 항의 화합물을 포유류 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 포유류 환자에서 KSP를 억제하는 방법.

청구항 31

치료요법에 사용하기 위한 제1항 내지 제21항 중 어느 한 항의 화합물.

청구항 32

제31항에 있어서, 세포 증식성 장애의 치료에 사용하기 위한 화합물.

청구항 33

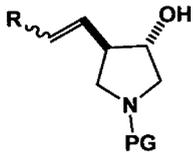
제32항에 있어서, 세포 증식성 장애가 폐암 및 기관지암; 전립선암; 유방암; 췌장암; 결장암 및 직장암; 갑상선암; 위암; 간암 및 간내담관암; 신장암 및 신우암; 방광암; 자궁체부암; 자궁경부암; 난소암; 다발성 골수종; 식도암; 급성 골수양 백혈병; 만성 골수양 백혈병; 림프구성 백혈병; 골수양 백혈병; 뇌암; 구강암 및 인두암; 후두암; 소장암; 비-호지킨 림프종; 흑색종; 및 결장 용모 선종으로 이루어진 군으로부터 선택된 암인 화합물.

청구항 34

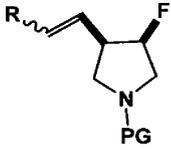
하기 화학식 V의 트랜스-3,4-이치환된 보호된 피롤리딘을 플루오르화 시약과 반응시켜 하기 화학식 VI의 화합물을 제공하는 단계, 및

화학식 VI의 화합물을 하기 화학식 VII의 알데히드로 산화키는 단계를 포함하는, 플루오르화된 피롤리딘의 제조 방법.

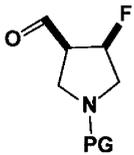
<화학식 V>



<화학식 VI>



<화학식 VII>

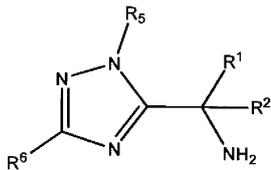


(상기 식에서, PG는 보호기를 나타내고, R은 H 및 임의로 치환된 알킬 또는 아릴 기로부터 선택됨)

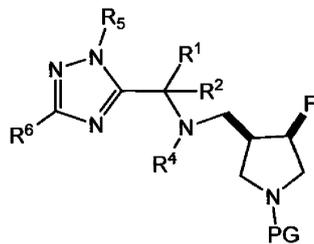
청구항 35

제34항에 있어서, 화학식 VII의 화합물의 하기 화학식 Ia의 화합물을 사용한 환원성 아미노화를 통해 하기 화학식 Ib의 화합물을 제공하는 단계를 더 포함하는 방법.

<화학식 Ia>



<화학식 Ib>



(상기 식에서,

R^1 은 C_{1-6} 알콕시- C_{1-4} -알킬, C_{1-6} 직쇄 알킬, C_{3-6} 분지형 알킬 및 $-C_{3-6}$ 시클로 알킬로부터 선택되고;

R^2 는 H 및 C_{1-6} 직쇄 알킬로부터 선택되고;

R^5 는 치환되거나 비치환된 벤질로부터 선택되며, 여기서 치환체는 Cl, F, Br 및 I로부터 선택되고;

R^6 은 3개 이하의 할로젠 원자로 치환된 페닐로부터 선택됨)

청구항 36

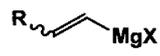
제34항에 있어서, 하기 화학식 IV의 에폭시드를 화학식 의 유기금속 시약으로 개환시켜, 상기 에폭시드로부터 화학식 V의 화합물을 합성하는 단계를 더 포함하는 방법.

<화학식 IV>



(상기 식에서, R은 H이거나 또는 임의로 치환된 알킬 또는 알릴 기이고, M은 Li, MgX 및 ZnX (여기서, X는 할로젠임)로부터 선택된 금속 기임).

청구항 37

제36항에 있어서, 유기금속 시약이  (여기서, X는 Cl, Br 또는 I임)인 방법.

명세서

기술분야

[0001] 관련 출원의 교차-참조

[0002] 본 출원은 35 U.S.C. § 119(e) 하에서 2010년 4월 15일에 출원된 미국 가출원 일련 번호 61/324,651에 대한 이 점을 청구하며, 이는 본원에 그 전문이 참고로 포함된다.

[0003] 본 발명의 분야

[0004] 본 발명은 일반적으로 트리아졸 화합물, 및 이의 제약상 허용되는 염, 에스테르 또는 전구약물에 관한 것이다. 본 발명은 또한 이들 화합물과 제약상 허용되는 담체의 조성물, 상기 화합물의 용도, 이들의 제법 및 관련 중간체에 관한 것이다.

배경기술

[0005] 키네신이란, 미세소관에 결합하고 기계적인 힘을 생성하기 위해 아데노신 트리포스페이트를 사용하는 모터 단백질이다. 키네신은 약 350개의 아미노산 잔기를 갖는 모터 도메인을 특징으로 한다. 몇몇 키네신 모터 도메인의 결정 구조가 분석되었다.

[0006] 현재, 약 100가지의 키네신-관련 단백질 (KRP)이 확인되어 있다. 키네신은 세포기관 및 소낭의 수송, 및 세포체의 유지를 비롯한 다양한 세포 생물학적 과정에 관여한다. 몇몇의 KRP는 방추체의 미세소관과 상호작용하거나 또는 염색체와 직접 상호작용하고, 세포 주기의 유사분열 단계 동안 주요 역할을 수행하는 것으로 나타난다. 이러한 유사분열 KRP는 암 치료제의 개발을 위해 특히 흥미롭다.

[0007] 키네신 스핀들(spindle) 단백질 (KSP) (Eg5, HsEg5, KNSL1 또는 KIF11로서도 공지됨)은, 방추체에 편재되고 양극성 방추체의 형성 및/또는 기능에 요구되는 것으로 공지된 몇몇 키네신-유사 모터 단백질 중 하나이다.

[0008] 1995년에는, KSP의 C 말단에 대한 항체를 사용하여 KSP를 고갈시키면, 일성상체(monoastral) 미세소관열이 사용되어 유사분열 중의 HeLa 세포를 정지시키는 것으로 밝혀졌다 (문헌 [Blangy et al., Cell 83:1159-1169, 1995]). bimC 및 cut7 유전자 (KSP의 상동체인 것으로 여겨짐)에서의 돌연변이는 아스페르길루스 니둘란스 (*Aspergillus nidulans*) (문헌 [Enos, A.P., and N.R. Morris, Cell 60:1019-1027, 1990] 및 시조사카로마이세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*) (문헌 [Hagan, I., and M. Yanagida, Nature 347:563-566, 1990])에서 중심체 분리가 이루어지지 않도록 한다. ATRA (모든 트랜스-레티노산)로의 세포 처리 (이는 단백질 수준의 KSP

발현을 감소시킴), 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드를 사용한 KSP 고갈은, KSP가 모든 트랜스-레티노산의 항 증식성 활동에 관여할 수 있다는 것을 나타내는 DAN-G 채장 암종 세포에서 유의한 성장 억제를 나타냈다 (문헌 [Kaiser, A., et al., J. Biol. Chem. 274, 18925-18931, 1999]). 흥미롭게도, 제노퍼스 라비스 오로라 (*Xenopus laevis Aurora*)-관련 단백질 키나제 pEg2는 X1Eg5와 연관되고 이를 인산화시키는 것으로 나타났다 (문헌 [Giet, R., et al., J. Biol. Chem. 274:15005-15013, 1999]). 오로라-관련 키나제의 잠재적인 기질은 암 약물 개발을 위해 특히 흥미롭다. 예를 들어, 오로라 1 및 2 키나제는 단백질 및 RNA 수준에서 과발현되고, 유전자는 결장 암 환자에서 증폭된다.

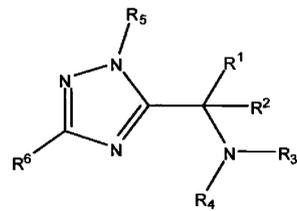
[0009] KSP를 위한 제1 세포 침투성 소분자 억제제인 "일성상체"는, 타산 및 빈카 알칼로이드(vinca alkaloid)와 같은 통상의 화학요법제와 같이 미세소관 중합에 영향을 미치지 않으면서도, 단극성 스펀들을 사용하여 세포를 정지시키는 것으로 나타났다 (문헌 [Mayer, T.U., et al., Science 286:971-974, 1999]). 일성상체는 표현형-기준의 스크리닝에서 억제제로서 확인되었고, 이는 상기 화합물이 항암 약물의 개발을 위한 지표로서 작용할 수 있다는 것을 제안하였다. 상기 억제는 아테노신 트리포스페이트와 관련하여 경쟁적이지 않고 신속 가역적인 것으로 측정되었다 (문헌 [DeBonis, S., et al., Biochemistry, 42:338-349, 2003; Kapoor, T.M., et al., J. Cell Biol., 150:975-988, 2000]).

[0010] 개선된 화학요법의 중요성의 관점에서, KSP 및 KSP-관련 단백질의 효과적인 생체내 억제제인 KSP 억제제에 대한 필요가 존재한다.

발명의 내용

[0011] <발명의 요약>

[0012] 한 실시양태에서, 본 발명은 트리아졸 화합물, 및 이의 제약상 허용되는 염, 에스테르 또는 전구약물, 이들의 제법, 제약 조성물, 및 KSP 매개 질환의 치료를 위한 용도에 관한 것이며, 여기서 상기 화합물은 하기 화학식으로 나타낸다:



[0013]

[0014] 상기 식에서,

[0015] R¹은 C₁₋₆ 알콕시-C₁₋₄-알킬, C₁₋₆ 직쇄 알킬, C₃₋₆ 분지형 알킬 및 -C₃₋₆ 시클로 알킬로부터 선택될 수 있고;

[0016] R²는 H 및 C₁₋₆ 직쇄 알킬로부터 선택되고;

[0017] R³은 -(CH₂)₀₋₃ 치환되거나 비치환된 피롤리디닐 또는 임의로 치환된 C₃₋₅ 알킬을 나타내고;

[0018] R⁴는 -C(O)-CH₂OH, -C(O)-테트라히드로푸라닐, -C(O)-CH(CH₃)-OH, -C(O)-비치환된 모르폴리닐 및 3개 이하의 알킬 기로 치환된 -C(O)-모르폴리닐로부터 선택되고;

[0019] R⁵는 치환되거나 비치환된 벤질로부터 선택되며, 여기서 치환체는 Cl, F, Br 및 I로부터 선택되고;

[0020] R⁶은 3개 이하의 할로겐 원자로 치환된 페닐로부터 선택된다.

[0021] 화학식 I의 상기 화합물의 특정 실시양태에서,

[0022] R¹은 C₁₋₆ 직쇄 알킬, C₃₋₆ 분지형 알킬 및 -C₃₋₆ 시클로 알킬로부터 선택되고;

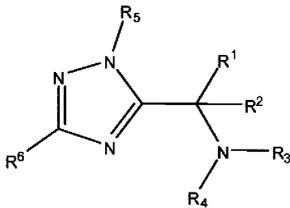
[0023] R²는 H 및 C₁₋₆ 직쇄 알킬로부터 선택되고;

- [0024] R³은 -(CH₂)₀₋₃ 치환되거나 비치환된 피롤리디닐을 나타내고;
- [0025] R⁴는 -C(O)-CH₂OH, -C(O)-테트라히드로푸라닐, -C(O)-CH(CH₃)-OH, -C(O)-비치환된 모르폴리닐 및 3개 이하의 알킬 기로 치환된 -C(O)-모르폴리닐로부터 선택되고;
- [0026] R⁵는 치환되거나 비치환된 벤질로부터 선택되며, 여기서 치환체는 Cl, F, Br 및 I로부터 선택되고;
- [0027] R⁶은 3개 이하의 할로겐 원자로 치환된 페닐로부터 선택된다.
- [0028] 다른 실시양태에서, R¹은 C₁₋₆알콕시-C₁₋₄알킬, 예컨대 메톡시-치환된 C₁₋₄ 알킬 및 2-메톡시-2-프로필이다.
- [0029] 또한, 본 발명은 이들 화합물의 제조 및 사용 방법, 및 본원에 추가로 기재된 바와 같은 이들 화합물을 함유하는 제약 조성물을 제공한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0030] 본 발명의 화합물은 하기 화학식 I의 화합물, 또는 그의 제약상 허용되는 염, 에스테르 또는 전구약물을 포함한다.

[0031] <화학식 I>



[0032]

[0033] (상기 식에서,

[0034] R¹은 C₁₋₆알콕시-C₁₋₄알킬, C₁₋₆ 직쇄 알킬, C₃₋₆ 분지형 알킬 및 C₃₋₆ 시클로 알킬로부터 선택되고;

[0035] R²는 H 및 C₁₋₆ 직쇄 알킬로부터 선택되고;

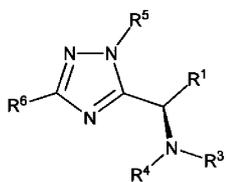
[0036] R³은 -(CH₂)₀₋₃-치환되거나 비치환된 피롤리디닐, 예컨대 -CH₂-피롤리디닐을 나타내고;

[0037] R⁴는 -C(O)-CH₂OH, -C(O)-테트라히드로푸라닐, -C(O)-CH(CH₃)-OH, -C(O)-비치환된 모르폴리닐 및 3개 이하의 알킬 기로 치환된 -C(O)-모르폴리닐로부터 선택되고;

[0038] R⁵는 치환되거나 비치환된 벤질로부터 선택되며, 여기서 치환체는 Cl, F, Br 및 I로부터 선택되고;

[0039] R⁶은 3개 이하의 할로겐 원자로 치환된 페닐로부터 선택됨)

[0040] 화학식 I의 화합물에서, R¹은 흔히 분지쇄 알킬 또는 알콕시 알킬이고, R²는 흔히 H이다. 바람직한 실시양태에서, 화학식 I의 화합물은 하기 이성질체일 수 있다:



[0041]

[0042] 이러한 화합물에서, R⁵는 흔히 벤질이며, 이는 벤질 기의 페닐 고리 상에서 3개 이하의 할로겐 원자로 임의로 치

환된다. R^5 는 비치환될 수 있으며, 치환되는 경우 이는 흔히 1 또는 2개의 플루오린 원자로 치환된다.

- [0043] R^6 은 전형적으로, 임의로 치환된 페닐 고리이고, 일부 실시양태에서 이는 1 또는 2개의 할로 기에 의해 치환된 페닐이다. 바람직한 실시양태에서, R^6 은 플루오로페닐 또는 디플루오로페닐, 특히 2,5-디플루오로페닐이다.
- [0044] 화학식 I의 이러한 화합물의 특정 실시양태에서, R^1 은 C_{1-6} 직쇄 알킬, C_{3-6} 분지형 알킬 및 $-C_{3-6}$ 시클로 알킬로부터 선택된다.
- [0045] 본 발명의 특정 실시양태는,
- [0046] R^1 이 C_{1-6} 알콕시- C_{1-4} 알킬, 바람직하게는 메톡시-치환된 C_{1-4} 알킬로부터 선택되고;
- [0047] R^2 가 H를 나타내고;
- [0048] R^3 이 $-(CH_2)_{1-3}$ -치환된 피롤리디닐을 나타내고;
- [0049] R^4 가 $-C(O)$ -테트라히드로푸라닐, $-C(O)-CH(CH_3)-OH$, 3개 이하의 알킬 기로 치환된 $-C(O)$ -모르폴리닐로부터 선택되고;
- [0050] R^5 가 벤질 또는 2개 이하의 플루오로 원자로 치환된 벤질을 나타내고;
- [0051] R^6 이 2개 이하의 할로젠 원자로 치환된 페닐로부터 선택된 것인, 화학식 I의 화합물을 제공한다.
- [0052] 본 발명의 추가의 바람직한 실시양태는,
- [0053] R^1 이 C_{3-6} 분지형 알킬로부터 선택되고;
- [0054] R^2 가 H를 나타내고;
- [0055] R^3 이 $-(CH_2)_{1-3}$ -치환된 피롤리디닐을 나타내고;
- [0056] R^4 가 $-C(O)$ -테트라히드로푸라닐, $-C(O)-CH(CH_3)-OH$, 3개 이하의 알킬 기로 치환된 $-C(O)$ -모르폴리닐로부터 선택되고;
- [0057] R^5 가 벤질 또는 2개 이하의 플루오로 원자로 치환된 벤질을 나타내고;
- [0058] R^6 이 2개 이하의 할로젠 원자로 치환된 페닐로부터 선택된 것인, 화학식 I의 화합물을 제공한다.
- [0059] 본 발명의 추가의 바람직한 실시양태는,
- [0060] R^1 이 t-부틸을 나타내고;
- [0061] R^3 이 $-(CH_2)$ -플루오로-피롤리디닐을 나타내고;
- [0062] R^4 가 $-C(O)$ -테트라히드로푸라닐, $-C(O)-CH(CH_3)-OH$, $-C(O)$ -2,6-디메틸 모르폴리닐로부터 선택되고;
- [0063] R^5 가 벤질 또는 하나의 플루오로 원자로 치환된 벤질을 나타내고;
- [0064] R^6 이 2개 이하의 플루오로 원자로 치환된 페닐로부터 선택된 것인, 화학식 I의 화합물을 제공한다.
- [0065] 본 발명의 추가의 바람직한 실시양태는,
- [0066] R^1 이 메톡시- C_{1-4} 알킬을 나타내고;

[0067] R³이 -(CH₂)-플루오로-피롤리디닐을 나타내고;

[0068] R⁴가 -C(O)-테트라히드로푸라닐, -C(O)-CH(CH₃)-OH, -C(O)-2,6-디메틸 모르폴리닐로부터 선택되고;

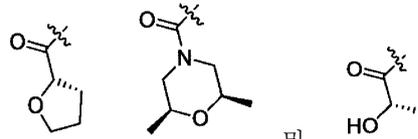
[0069] R⁵가 벤질 또는 하나의 플루오로 원자로 치환된 벤질을 나타내고;

[0070] R⁶이 2개 이하의 플루오로 원자로 치환된 페닐로부터 선택된 것인, 화학식 I의 화합물을 제공한다.

[0071] 또다른 바람직한 실시양태는,

[0072] R³이 -(CH₂)₁₋₃-플루오로-피롤리디닐을 나타내고;

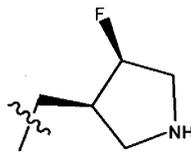
[0073] R⁴가 -C(O)-2-테트라히드로푸라닐, -C(O)-CH(CH₃)-OH, -C(O)-2,6-디메틸 모르폴리닐을 나타내는 것인, 화학식 I



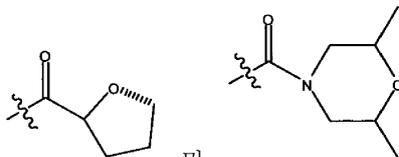
의 화합물을 제공한다. 특히 바람직한 실시양태에서, R⁴는 , 및 로부터 선택된다.

[0074] 이러한 R⁴ 기는 라세미체이거나 또는 광학 활성일 수 있으며, 바람직한 실시양태에서 R⁴는 분원에 도시된 절대 입체화학을 갖는 광학 활성인 기이다. 전형적으로, 이는 1가지의 거울상이성질체이며, 실질적으로 이의 반대 거울상이성질체를 함유하지 않는다 (즉, R⁴ 기는 적어도 90% 및 흔히 적어도 95%의 거울상이성질체 초과량을 가짐).

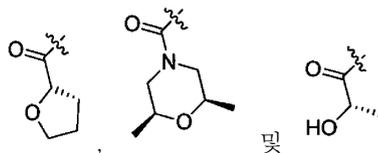
[0075] 본 발명의 또다른 바람직한 실시양태는,



[0076] R³이 ((3R,4R)-4-플루오로피롤리딘-3-일)메틸 기 를 나타내고;

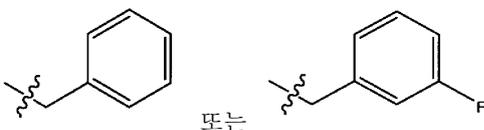


[0077] R⁴가 -C(O)-CH(CH₃)-OH, 및 로부터 선택된 것인, 화학식 I의 화합물을 제공한다.

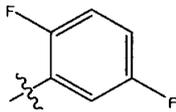


[0078] 특히 바람직한 실시양태에서, R⁴는 , 및 로부터 선택된다.

[0079] 본 발명의 추가의 바람직한 실시양태는,



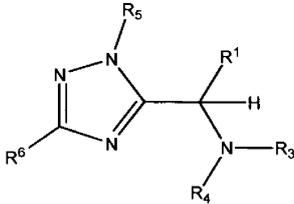
[0080] R⁵가 또는 를 나타내고;



[0081] R⁶이 인, 화학식 I의 화합물을 제공한다.

[0082] 또다른 실시양태에서, 본 발명은 하기 화학식 II의 화합물을 제공한다.

[0083] <화학식 II>



[0084] (상기 식에서,
[0085]

[0086] R¹은 C₁₋₆ 알콕시-C₁₋₄-알킬, C₁₋₆ 직쇄 알킬, C₃₋₆ 분지형 알킬 및 -C₃₋₆ 시클로 알킬로부터 선택될 수 있고;

[0087] R³은 -(CH₂)₀₋₃-치환되거나 비치환된 피롤리디닐, 또는 아미노 및 할로로부터 선택된 3개 이하의 기로 치환된 C₃₋₅ 알킬을 나타내고;

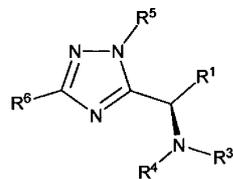
[0088] R⁴는 -C(O)-CH₂OH, -C(O)-테트라히드로푸라닐, -C(O)-CH(CH₃)-OH, -C(O)-비치환된 모르폴리닐 및 3개 이하의 알킬 기로 치환된 -C(O)-모르폴리닐로부터 선택되고;

[0089] R⁵는 치환되거나 비치환된 벤질로부터 선택되며, 여기서 치환체는 Cl, F, Br 및 I로부터 선택되고 (바람직하게는, F임);

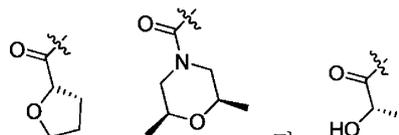
[0090] R⁶은 3개 이하의 할로겐 원자, 바람직하게는 F 또는 Cl 또는 둘 모두로 치환된 페닐로부터 선택됨)

[0091] 화학식 II (여기서, R⁵ 또는 R⁶은 치환됨)의 화합물에서, 바람직한 치환체는 F 및 Cl이다.

[0092] 화학식 II의 화합물에서, R¹은 흔히 메톡시와 같은 알콕시 기로 치환된 분지쇄 알킬이고, R²는 흔히 H이다. 바

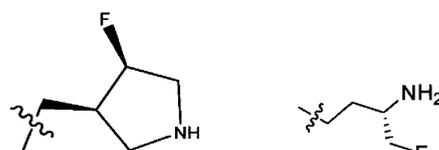


람직한 실시양태에서, 화학식 II의 화합물은 의 절대 입체화학을 갖는 이러한 이성질체일 수 있다.



[0093] 화학식 II의 화합물의 특히 바람직한 실시양태에서, R⁴는 로부터 선택된다.

[0094] 바람직하게는, 이러한 기는 광학 활성이며, 상기 나타낸 절대 입체화학을 갖는다.



[0095] 본 발명의 또다른 바람직한 실시양태는, R³이 을 나타내는 화학식 II의

화합물을 제공한다.

[0096] 이러한 R³ 기는 라세미체이거나 또는 광학 활성일 수 있으며, 바람직한 실시양태에서 R³은 본원에 도시된 절대 입체화학을 갖는 광학 활성인 기이다. 전형적으로, 이는 1가지 거울상이성질체이며, 실질적으로 이의 반대 거울상이성질체를 함유하지 않는다 (즉, R³ 기는 적어도 90% 및 흔히 적어도 95%의 거울상이성질체 초과량을 가짐).

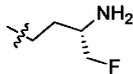
[0097] 화학식 II의 화합물에서, R⁵는 흔히 벤질이며, 이는 벤질 기의 페닐 고리 상에서 3개 이하의 할로젠 원자로 임의로 치환된다. R⁵는 비치환될 수 있으며, 치환되는 경우 이는 흔히 1 또는 2개의 플루오린 원자로 치환된다.

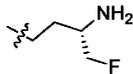
[0098] 화학식 II의 화합물에서, R⁶은 전형적으로, 임의로 치환된 페닐 고리이며, 일부 실시양태에서 이는 1 내지 2개 할로 기에 의해 치환된 페닐이다. 바람직한 실시양태에서, R⁶은 플루오로페닐 또는 디플루오로페닐, 바람직하게는 2,5-디플루오로페닐이다.

[0099] 화학식 II의 이러한 화합물의 특정 실시양태에서,

[0100] R¹은 C₁₋₆ 알콕시-C₁₋₄-알킬, C₃₋₆ 분지형 알킬 및 C₃₋₆ 시클로 알킬로부터 선택되고;

[0101] R³은 -(CH₂)₀₋₃-치환된 피롤리딘, 예컨대 ((3R,4R)-4-플루오로피롤리딘-3-일)메틸 기 또는 -CH₂-CH₂-CH(NH₂)-



CH₂F (이는 바람직하게는  임)를 나타내고;

[0102] R⁴는 -C(O)-CH₂OH, -C(O)-테트라히드로푸라닐, -C(O)-CH(CH₃)-OH, -C(O)-비치환된 모르폴리닐 및 3개 이하의 알킬 기로 치환된 -C(O)-모르폴리닐로부터 선택되고;

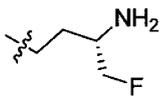
[0103] R⁵는 치환되거나 비치환된 벤질로부터 선택되며, 여기서 치환체는 Cl, F, Br 및 I로부터 선택되고;

[0104] R⁶은 3개 이하의 할로젠 원자로 치환된 페닐로부터 선택된다.

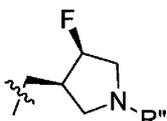
[0105] 화학식 II의 화합물의 특정 실시양태에서, R¹은 메톡시-치환된 C₁₋₄ 알킬이다. 이러한 화합물의 바람직한 실시양태에서, R¹은 2-메톡시-2-프로필이다.

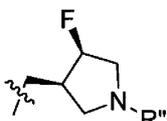
[0106] 화학식 II의 화합물에서, R³은 치환된 피롤리딘을 함유할 수 있으며, 예를 들어 이는 -(CH₂)₁₋₂-치환된 피롤리딘, 예컨대 ((3R,4R)-4-플루오로피롤리딘-3-일)메틸 기를 나타낼 수 있다. 피롤리딘은 고리의 임의의 위치에서, 전형적으로 탄소 원자에서, 바람직하게는 고리 질소 원자를 위치 1로 계수하는 경우 위치 3에서 부착될 수 있다. 피롤리딘 기는 할로, 저급 알킬 및 저급 알콕시와 같은 기로 치환될 수 있다. 바람직하게는, 피롤리딘 고리는 고리 탄소 원자 상에서 적어도 하나의 할로, 일반적으로 F에 의해 치환되고, 또한 이는 임의로 저급 알킬, 전형적으로 Me 또는 Et에 의해 치환되며, 임의로 저급 알킬은 N 상에 있다.

[0107] 화학식 II의 상기 기재된 임의의 화합물의 바람직한 실시양태에서, R³은 -CH₂-CH₂-CH(NH₂)-CH₂F, 예컨대

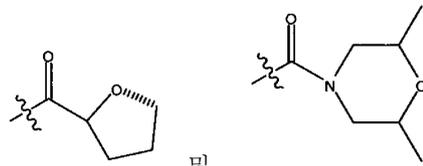


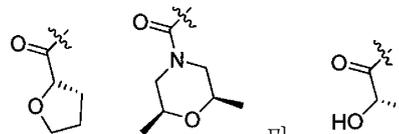
또는 -(CH₂)₁₋₂-치환된 피롤리딘을 나타내며, 여기서 -(CH₂)₁₋₂-치환된 피롤리딘 기는 예를

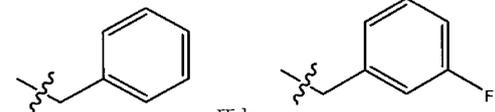


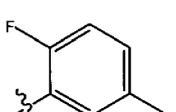
들어,  (여기서, R''는 H, Me, Et, 이소프로필 또는 n-프로필임)일 수 있다. 바람직하게는, 피롤리딘 기는 본원에 나타낸 절대 입체화학적 배열을 갖는다 (즉, 이는 ((3R,4R)-4-플루오로피롤리딘-3-일)메틸 기이며, 여기서 R''는 H, Me, Et, 이소프로필 또는 n-프로필임).

[0108] 화학식 II의 화합물의 바람직한 실시양태에서, R⁴는 -C(O)-CH(CH₃)-OH, 로부터 선택된다.



[0109] 이러한 화합물의 특히 바람직한 실시양태에서, R⁴는  로부터 선택된다.

[0110] 또한, 이러한 화합물에서 바람직하게는, R⁵는  을 나타내고;

[0111] 이러한 몇몇 실시양태에서, R⁶은  이다.

[0112] 본 발명의 특히 바람직한 실시양태는,

[0113] N-((R)-1-(3-(2,5-디플루오로페닐)-1-(3-플루오로벤질)-1H-1,2,4-트리아졸-5-일)-2,2-디메틸프로필)-N-(((3R,4R)-4-플루오로피롤리딘-3-일)메틸)-2,6-디메틸모르폴린-4-카르복스아미드;

[0114] N-((R)-1-(1-벤질-3-(2,5-디플루오로페닐)-1H-1,2,4-트리아졸-5-일)-2,2-디메틸프로필)-N-(((3R,4R)-4-플루오로피롤리딘-3-일)메틸)-2,6-디메틸모르폴린-4-카르복스아미드;

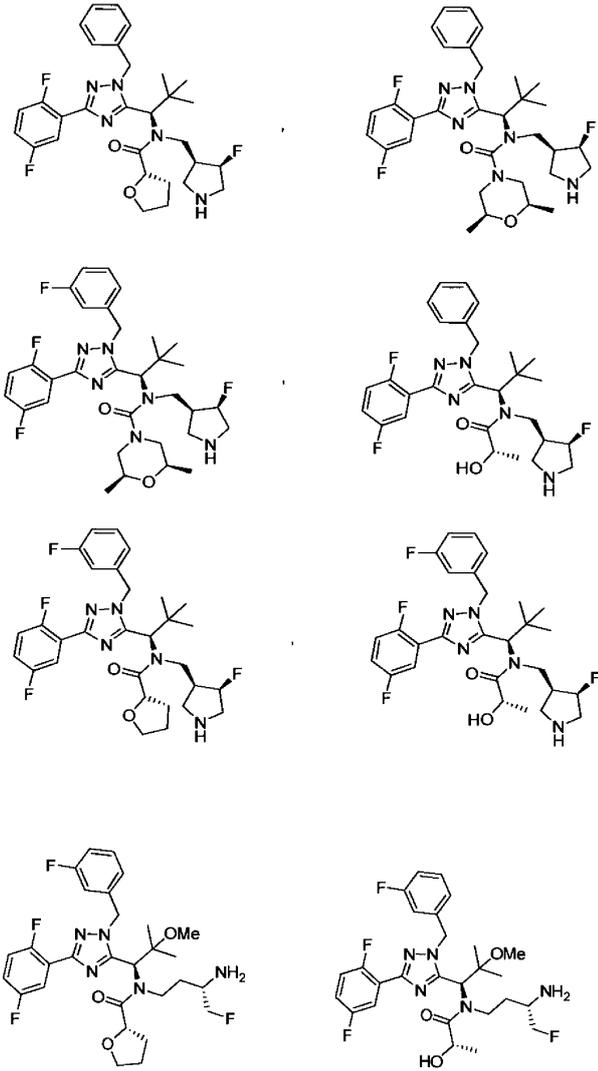
[0115] (S)-N-((R)-1-(1-벤질-3-(2,5-디플루오로페닐)-1H-1,2,4-트리아졸-5-일)-2,2-디메틸프로필)-N-(((3R,4R)-4-플루오로피롤리딘-3-일)메틸)테트라히드로푸란-2-카르복스아미드;

[0116] (S)-N-((R)-1-(3-(2,5-디플루오로페닐)-1-(3-플루오로벤질)-1H-1,2,4-트리아졸-5-일)-2,2-디메틸프로필)-N-(((3R,4R)-4-플루오로피롤리딘-3-일)메틸)테트라히드로푸란-2-카르복스아미드;

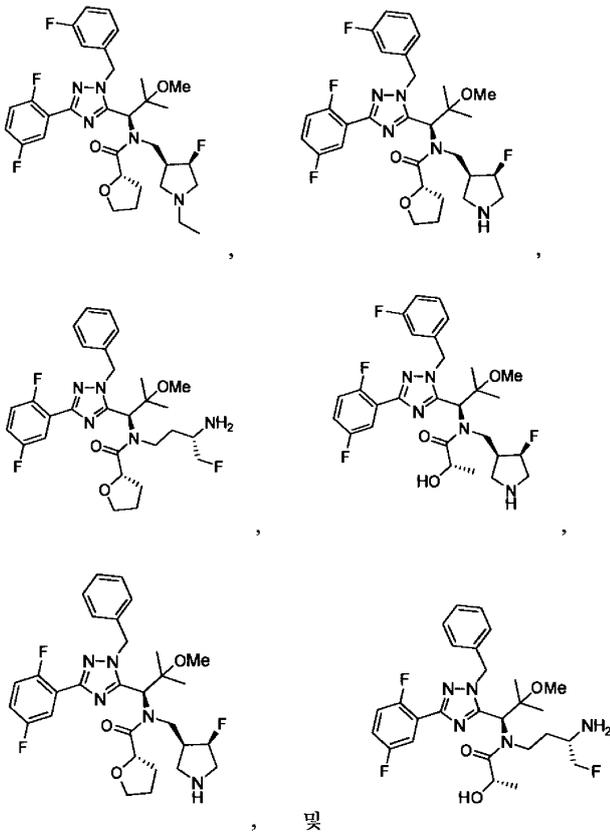
[0117] (S)-N-((R)-1-(3-(2,5-디플루오로페닐)-1-(3-플루오로벤질)-1H-1,2,4-트리아졸-5-일)-2,2-디메틸프로필)-N-(((3R,4R)-4-플루오로피롤리딘-3-일)메틸)-2-히드록시프로판아미드; 및

[0118] (S)-N-((R)-1-(1-벤질-3-(2,5-디플루오로페닐)-1H-1,2,4-트리아졸-5-일)-2,2-디메틸프로필)-N-(((3R,4R)-4-플루오로피롤리딘-3-일)메틸)-2-히드록시프로판아미드로부터 선택된 화학식 I 또는 II의 화합물을 제공한다.

[0119] 본 발명의 특히 바람직한 또다른 실시양태는,



[0120]



[0121]

[0122]로부터 선택된 화학식 I 또는 II의 화합물 및 이들 화합물의 제약상 허용되는 염을 제공한다.

[0123] 본 발명의 또다른 측면은, 치료 유효량의 화학식 I 또는 II의 화합물 (상기 개시된 화합물의 임의의 실시양태 포함) 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물을 제공한다. 본 발명의 이러한 측면의 바람직한 실시양태는 암의 치료를 위한 1종 이상의 추가의 작용제를 더 포함하는 조성물을 제공한다. 추가의 바람직한 실시양태에서, 암의 치료를 위한 추가의 작용제가 이리노테칸, 토포테칸, 켈시타빈, 이마티닙, 트라스투주맙, 5-플루오로우라실, 류코보린, 카보플라틴, 시스플라틴, 도세탁셀, 파클리탁셀, 테자시타빈, 시클로포스파미드, 빈카알칼로이드, 안트라사이클린, 리톡시맙 및 트라스투주맙으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 조성물이 제공된다.

[0124] 본 발명의 또다른 측면에서, KSP에 의해 적어도 부분적으로 매개되는 장애의 치료를 필요로 하는 포유류 환자에게 화학식 I 또는 II의 화합물 (상기 개시된 화합물의 임의의 실시양태 포함)을 포함하는 치료 유효량의 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 포유류 환자에서 KSP에 의해 적어도 부분적으로 매개되는 장애를 치료하는 방법이 제공된다. 하나의 바람직한 실시양태는, KSP에 의해 적어도 부분적으로 매개되는 장애의 치료를 필요로 하는 포유류 환자에게 상기 기재된 화학식 I 또는 II의 화합물의 임의의 실시양태의 화합물 및 암의 치료를 위한 1종 이상의 추가의 작용제를 포함하는 치료 유효량의 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 포유류 환자에서 KSP에 의해 적어도 부분적으로 매개되는 장애를 치료하는 방법을 제공한다. 본 발명의 이러한 측면의 바람직한 실시양태는 포유류 환자에서 KSP에 의해 적어도 부분적으로 매개되는 장애 (장애는 세포 증식성 질환이며, 바람직하게는 세포 증식성 질환은 암)를 치료하는 방법을 제공한다.

[0125] 본 발명의 이러한 측면의 추가의 바람직한 실시양태는 상기 개시된 세포 증식성 질환을 치료하는 방법을 제공하며, 여기서 세포 증식성 질환은 폐암 및 기관지암; 전립선암; 유방암; 췌장암; 결장암 및 직장암; 갑상선암; 위암; 간암 및 간내담관암; 신장암 및 신우암; 방광암; 자궁체부암; 자궁경부암; 난소암; 다발성 골수종; 식도암; 급성 골수양 백혈병; 만성 골수양 백혈병; 림프구성 백혈병; 골수양 백혈병; 뇌암; 구강암 및 인두암; 후두암; 소장암; 비-호지킨(non-Hodgkin) 림프종; 흑색종; 및 결장 용모 선종으로 이루어진 군으로부터 선택된 암이다.

[0126] 본 발명의 이러한 측면의 또다른 바람직한 실시양태는, 암을 치료하기 위한 추가의 작용제가 이리노테칸, 토포테칸, 켈시타빈, 이마티닙, 트라스투주맙, 5-플루오로우라실, 류코보린, 카보플라틴, 시스플라틴, 도세탁셀, 파클리탁셀, 테자시타빈, 시클로포스파미드, 빈카알칼로이드, 안트라사이클린, 리톡시맙 및 트라스투주맙으로 이

투어린 군으로부터 선택된 것인 방법을 제공한다.

- [0127] 본 측면의 특히 바람직한 실시양태는, 포유류 환자에게 본원에 기재된 임의의 실시양태에 따른 유효한 KSP-억제량의 화학식 I 또는 II의 화합물을 투여하는 것을 포함하는, 포유류 환자에서 KSP를 억제하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 상기 기재된 화학식 I 또는 II의 화합물, 예를 들어 화학식 I의 화합물을 사용하며, 상기 식에서
- [0128] R^1 은 C_{1-6} 직쇄 알킬, C_{3-6} 분지형 알킬 및 $-C_{3-6}$ 시클로 알킬로부터 선택되고;
- [0129] R^2 는 H 및 C_{1-6} 직쇄 알킬로부터 선택되고;
- [0130] R^3 은 $-(CH_2)_{0-3}$ 치환되거나 비치환된 피롤리디닐을 나타내고;
- [0131] R^4 는 $-C(O)-CH_2OH$, $-C(O)-테트라히드로푸라닐$, $-C(O)-CH(CH_3)-OH$, $-C(O)-$ 비치환된 모르폴리닐 및 3개 이하의 알킬 기로 치환된 $-C(O)-$ 모르폴리닐로부터 선택되고;
- [0132] R^5 는 치환되거나 비치환된 벤질로부터 선택되며, 여기서 치환체는 Cl, F, Br 및 I로부터 선택되고;
- [0133] R^6 은 3개 이하의 할로겐 원자로 치환된 페닐로부터 선택된다.
- [0134] 이러한 방법에 대한 환자는 일반적으로 인간이고, 이들은 전형적으로 이러한 방법을 개시하기 전에, 상기 치료가 필요한 것으로 진단된다.
- [0135] 또다른 바람직한 실시양태는, 상기 환자에게 상기 기재된 임의의 실시양태에 따른 유효한 KSP-억제량의 화학식 I 또는 II의 화합물을 투여하는 것을 포함하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 화학식 I의 화합물을 사용하며, 상기 식에서
- [0136] R^1 은 C_{3-6} 분지형 알킬로부터 선택되고;
- [0137] R^2 는 H를 나타내고;
- [0138] R^3 은 $-(CH_2)_{1-3}$ -치환된 피롤리디닐을 나타내고;
- [0139] R^4 는 $-C(O)-테트라히드로푸라닐$, $-C(O)-CH(CH_3)-OH$, 3개 이하의 알킬 기로 치환된 $-C(O)-$ 모르폴리닐로부터 선택되고;
- [0140] R^5 는 벤질 또는 2개 이상의 플루오로 원자로 치환된 벤질을 나타내고;
- [0141] R^6 은 2개 이하의 할로겐 원자로 치환된 페닐로부터 선택된다.
- [0142] 추가의 특히 바람직한 실시양태는 화학식 I의 화합물을 투여하는 것을 포함하는 방법을 제공하며, 상기 식에서
- [0143] R^1 은 t-부틸을 나타내고;
- [0144] R^3 은 $-(CH_2)$ -플루오로-피롤리디닐을 나타내고;
- [0145] R^4 는 $-C(O)-테트라히드로푸라닐$, $-C(O)-CH(CH_3)-OH$, $-C(O)-2,6-$ 디메틸 모르폴리닐로부터 선택되고;
- [0146] R^5 는 벤질 또는 하나의 플루오로 원자로 치환된 벤질을 나타내고;
- [0147] R^6 은 2개 이하의 플루오로 원자로 치환된 페닐로부터 선택된다.
- [0148] 추가의 바람직한 실시양태는 화학식 II의 화합물을 투여하는 것을 포함하는 방법을 제공하며, 상기 식에서
- [0149] R^1 은 2-메톡시-2-프로필을 나타내고;

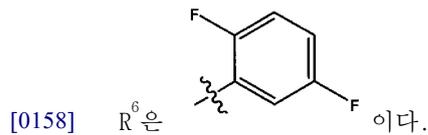
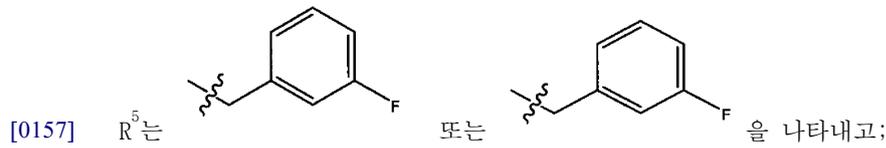
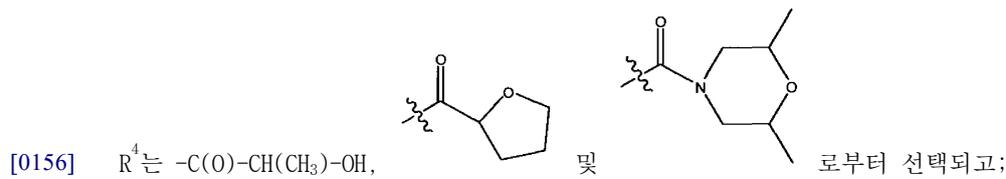
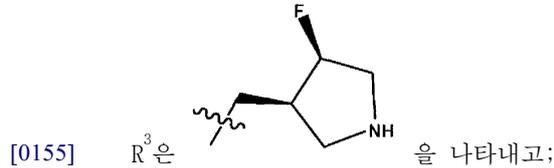
[0150] R³은 -(CH₂)-플루오로-피롤리딘 또는 -CH₂-CH₂-CH(NH₂)-CH₂F를 나타내고;

[0151] R⁴는 -C(O)-테트라히드로푸라닐, -C(O)-CH(CH₃)-OH, -C(O)-2,6-디메틸 모르폴리닐로부터 선택되고;

[0152] R⁵는 벤질 또는 하나의 플루오로 원자로 치환된 벤질을 나타내고;

[0153] R⁶은 2개 이하의 플루오로 원자로 치환된 페닐로부터 선택된다.

[0154] 특히 바람직한 또다른 실시양태는 화학식 I 또는 II의 화합물을 투여하여 암과 같은 병태를 치료하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 상기 기재된 임의의 실시양태에 따른 화합물, 예를 들어 I 또는 II의 화합물을 사용할 수 있으며, 상기 식에서



[0159] 상기 기재된 치료 방법의 특히 바람직한 실시양태는, 포유류 환자에게 유효한 KSP-억제량의 하기로부터 선택된 화학식 I의 화합물을 투여하는 것을 포함하는, 포유류 환자에서 KSP를 억제하는 방법을 제공한다:

[0160] N-((R)-1-(3-(2,5-디플루오로페닐)-1-(3-플루오로벤질)-1H-1,2,4-트리아졸-5-일)-2,2-디메틸프로필)-N-(((3R,4R)-4-플루오로피롤리딘-3-일)메틸)-2,6-디메틸모르폴린-4-카르복스아미드;

[0161] N-((R)-1-(1-벤질-3-(2,5-디플루오로페닐)-1H-1,2,4-트리아졸-5-일)-2,2-디메틸프로필)-N-(((3R,4R)-4-플루오로피롤리딘-3-일)메틸)-2,6-디메틸모르폴린-4-카르복스아미드;

[0162] (S)-N-((R)-1-(1-벤질-3-(2,5-디플루오로페닐)-1H-1,2,4-트리아졸-5-일)-2,2-디메틸프로필)-N-(((3R,4R)-4-플루오로피롤리딘-3-일)메틸)테트라히드로푸란-2-카르복스아미드;

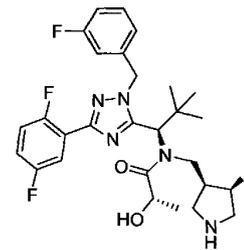
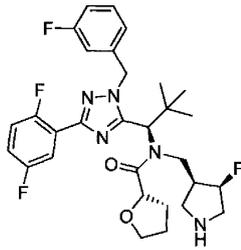
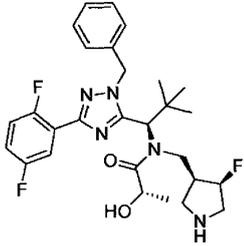
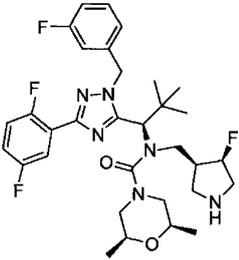
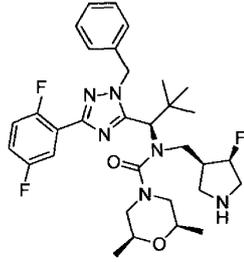
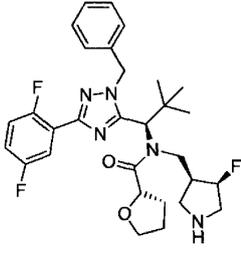
[0163] (S)-N-((R)-1-(3-(2,5-디플루오로페닐)-1-(3-플루오로벤질)-1H-1,2,4-트리아졸-5-일)-2,2-디메틸프로필)-N-(((3R,4R)-4-플루오로피롤리딘-3-일)메틸)테트라히드로푸란-2-카르복스아미드;

[0164] (S)-N-((R)-1-(3-(2,5-디플루오로페닐)-1-(3-플루오로벤질)-1H-1,2,4-트리아졸-5-일)-2,2-디메틸프로필)-N-(((3R,4R)-4-플루오로피롤리딘-3-일)메틸)-2-히드록시프로판아미드; 및

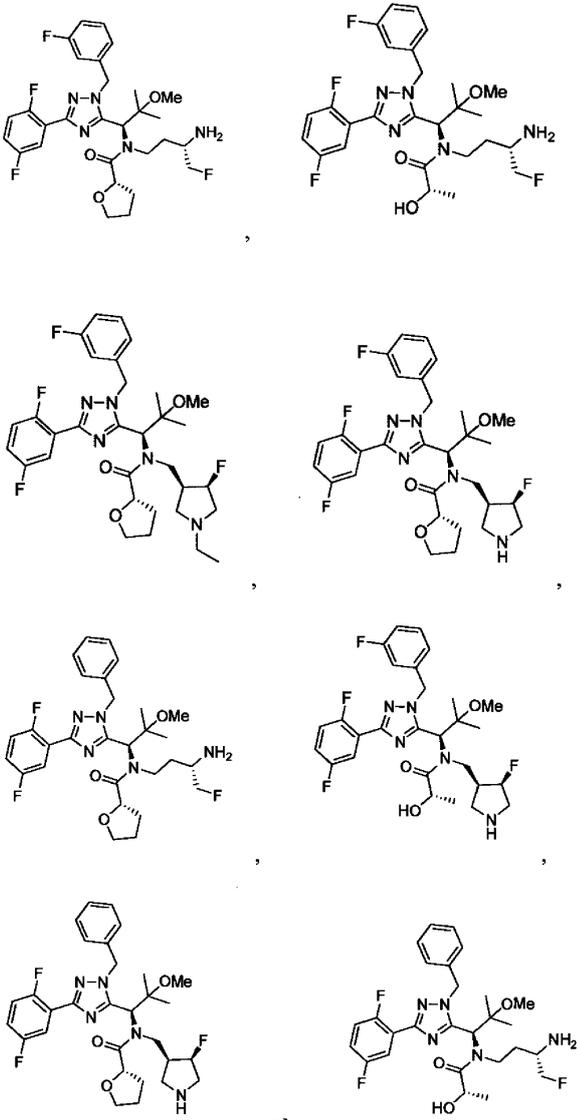
[0165] (S)-N-((R)-1-(1-벤질-3-(2,5-디플루오로페닐)-1H-1,2,4-트리아졸-5-일)-2,2-디메틸프로필)-N-(((3R,4R)-4-플루오로피롤리딘-3-일)메틸)-2-히드록시프로판아미드.

[0166] 특히 바람직한 또다른 실시양태는, 포유류 환자에게 하기로부터 선택된 유효한 KSP-억제량의 화학식 I 또는 II의 화합물 또는 이들 화합물 중 하나의 제약상 허용되는 염을 투여하는 것을 포함하는, 포유류 환자에서 KSP를

억제하는 방법을 제공한다:



[0167]

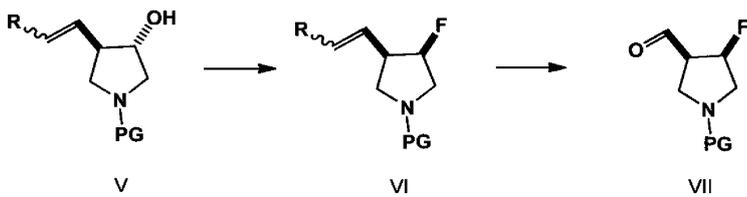


[0168]

및

[0169]

또다른 측면에서, 본 발명은 화학식 I 또는 II의 특정 화합물 및 이들의 합성을 위한 중요한 중간체의 제조 방법을 제공한다. 본원의 반응식 2에, 상기 도식된 바와 같은 화합물을 위한 바람직한 피롤리딘 고리 잔기를 제조하는 하나의 방법이 도식되어 있다. 이러한 플루오르화된 피롤리딘의 합성 방법은, 화학식 V의 트랜스-3,4-이치환된 피롤리딘을 플루오르화시켜 화학식 VI의 시스-플루오르화된 비닐 피롤리딘 화합물을 제공하는 단계 및 화학식 VI의 화합물의 올레핀을 산화시켜 하기 나타낸 화학식 VII의 알데히드를 제공하는 단계를 포함한다:



[0170]

[0171]

이러한 변형은 라세미 화합물 상에서 또는 광학 활성인 화합물을 이용하여 이루어질 수 있으며, 일부 실시양태에서 화학식 V 또는 VI 또는 VII의 화합물은 광학 활성이고, 적어도 90%의 이성질체 초과량을 갖으며 본원에 나타낸 절대 입체화학을 갖는다. 화학식 V 내지 VII의 화합물에서, R은 H이거나 또는 임의로 치환된 C₁-C₆ 알킬 또는 아릴이고, PG는 지방족 질소 원자 상에서 사용하기에 적합한 보호기를 나타낸다. 일부 실시양태에서, R은 H이고, 화학식 V의 화합물은 보호된 3-피롤린 (반응식 2의 화합물 2.3 참조)의 에폭시드로부터, 예를 들어 그리냐드(Grignard) 시약을 사용한 에폭시드의 반응에 의해 제조될 수 있다. 화학식 V의 트랜스-히드록시

기를, S_N2 교환을 제공하는 임의의 적합한 시약을 사용하여 화학식 VI의 시스-플루오로 기로 전환하여, 키랄 중심의 도치를 달성할 수 있다. 일부 실시양태에서 이는, 불활성 용매 중의 불소 공급원, 및 히드록실을 활성화시켜 이를 적합한 이탈기로 만드는 시약을 사용하여 달성된다. 예를 들어, 플루오라이드 염, 예컨대 트리알킬아민 트리히드로플루오라이드 (예를 들어, Et₃N-트리히드로플루오라이드) 또는 HF-피리딘은 반응 조건에 불활성인 적합한 용매에서 알킬 또는 아릴 술포닐 플루오라이드, 예컨대 C₁-C₆ 퍼플루오르알킬 술포닐 플루오라이드와 함께 사용되어, 입체화학적 도치를 갖으며 히드록실을 F로 전환시킬 수 있다.

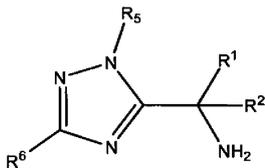
[0172] 화학식 VI의 화합물에서의 비닐위치(vinylogous) 기는 통상의 다양한 방법, 예컨대 오스뎀 테트록시드 및 나트륨 메타페리오데이트를 사용한 처리를 이용함으로써 또는 오존을 이용함으로써 알데히드로 산화되어, 화학식 VII의 화합물을 제공할 수 있다. 이러한 변형을 위한 방법은 당업계에 공지되어 있다.

[0173] 이어서, 화학식 VII의 화합물은, 본원에 기재된 환원성 아미노화 반응; 또는 상기 알데히드 및 목적하는 표적 화합물에 대해 적합한 친핵성 탄소 기와 함께 사용하도록 당업계에 공지되어 있는 다양한 친핵성 첨가 반응을 비롯한 다양한 방법에 의해 화학식 I의 화합물에 혼입될 수 있다. 한 실시양태에서, 화학식 VII의 화합물은 환원성 아미노화를 통해 반응식 3에 나타낸 화학식 Ia의 화합물에 부착되어, 하기 예시된 화학식 Ib의 화합물을 제공한다. 화학식 Ia (여기서, R³은 H임)의 화합물은, 이들이 보호가 요구되는 유리 아민 또는 히드록실과 같은 기를 포함하는 경우에, 임의로 보호된다.

[0174] 이러한 반응 및 중간체에 사용하기에 적합한 보호기 (PG)는 아마이드 (예를 들어, 포름아미드, 아세트아미드, 트리클로로아세트아미드) 및 카르바메이트 (예를 들어, 메틸, 에틸, 트리클로로에틸, t-부틸 또는 벤질 카르바메이트)를 포함한다. 아마이드 및 카르바메이트는 일반식 -C(O)-L-A를 갖으며, 여기서 L은 결합 (아미드인 경우) 또는 -O- (카르바메이트인 경우)이고, A는 임의로 치환된 알킬 (바람직하게는 C₁₋₆) 또는 아릴 (바람직하게는 페닐)이거나; 또는 A는 L이 결합인 경우, H일 수 있다.

[0175] 일부 실시양태에서, 이러한 방법은, 하기 화학식 Ia의 화합물을 사용하여 화학식 VII의 화합물을 환원성 아미노화시켜 하기 화학식 Ib의 화합물을 제공하는 단계를 더 포함한다.

[0176] <화학식 Ia>



[0177]

[0178] (상기 식에서,

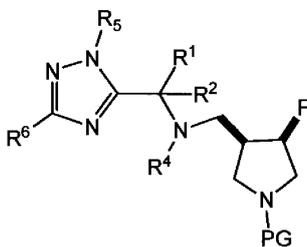
[0179] R¹은 C₁₋₆알콕시-C₁₋₄알킬, C₁₋₆ 직쇄 알킬, C₃₋₆ 분지형 알킬 및 -C₃₋₆ 시클로 알킬로부터 선택되고;

[0180] R²는 H 및 C₁₋₆ 직쇄 알킬로부터 선택되고;

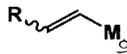
[0181] R⁵는 치환되거나 비치환된 벤질로부터 선택되며, 여기서 치환체는 Cl, F, Br 및 I로부터 선택되고;

[0182] R⁶은 3개 이하의 할로젠 원자로 치환된 페닐로부터 선택됨)

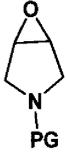
[0183] <화학식 Ib>



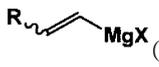
[0184]

[0185] 일부 실시양태에서, 상기의 임의의 합성 방법은, 하기 화학식 IV의 에폭시드를 화학식 의 유기금속 시약으로 개환시켜, 상기 에폭시드로부터 화학식 V의 화합물을 합성하여 화학식 V의 화합물을 제공하는 단계를 더 포함한다.

[0186] <화학식 IV>



[0187]

[0188] (상기 식에서, R은 H이거나 또는 임의로 치환된 알킬 또는 아릴 기이고, M은 Li, MgX 및 ZnX (여기서, X는 할로젠임)로부터 선택된 금속 기임). 이러한 단계에 대해, 바람직한 유기금속 시약은  (여기서, X는 Cl, Br 또는 I임)이다.

[0189] 따라서, 본 발명은 상기 기재된 화학식 VI 및 VII의 신규한 중간체뿐만 아니라 화학식 I 또는 Ib의 화합물을 제조하기 위해 이러한 중간체를 사용하는 방법을 제공한다.

[0190] 이러한 방법에 사용되고 이에 의해 제조된 화합물은 라세미체일 수 있거나, 또는 적어도 하나의 키랄 중심을 갖는 임의의 화합물은 적절하게 단일의 거울상이성질체 또는 단일의 부분입체이성질체로 분리될 수 있다. 본 발명에서, 화학식 I 또는 Ib의 화합물의 제조에 단일의 거울상이성질체를 사용하기 위해, 화학식 V 또는 VI의 화합물의 2가지 거울상이성질체를 분리하는 것이 때때로 바람직하다. 일부 실시양태에서, 화학식 V 또는 VI의 화합물은 라세미 형태로 제조된 다음, 키랄 크로마토그래피 또는 다른 종래 수단에 의해 분리되어, 바람직하게는 이의 거울상이성질체를 본질적으로 함유하지 않는 광학 활성인 화합물을 제공한다. 바람직한 실시양태에서, 화학식 V 또는 VI의 화합물은 광학 활성이고, 본원에 도시된 특정의 절대 입체화학을 갖는다. 이러한 일부 실시양태에서, 이는 반대의 거울상이성질체를 본질적으로 함유하지 않는다.

[0191] **대표적인 본 발명의 화합물**

[0192] 본 발명의 범주 내의 특정 화합물은 실시예 부분의 표 1에 예시되어 있다.

[0193] B. 정의 및 개요

[0194] 상기 논의된 바와 같이, 본 발명은 부분적으로 새로운 치환된 트리아졸 화합물에 관한 것이다.

[0195] 본원에 사용된 용어는 특정 실시양태만을 기재하는 목적을 위한 것이고 본 발명의 범주를 제한하지 않는 것으로 이해해야 한다. 본원 및 청구범위에 사용되는 경우 단수 형태는 본문이 달리 명확하게 지시하지 않는 한 복수 지시대상을 포함한다는 것을 주의해야만 한다. 본 명세서 및 하기의 특허청구범위에서, 하기 의미를 갖는 것으로 정의되어야 하는 다수의 용어가 거명될 것이다:

[0196] 본원에 사용된 "알킬" 또는 "직쇄 알킬"은, 1 내지 6개의 탄소 원자 및 보다 바람직하게는 1 내지 3개의 탄소 원자를 갖는 1가 포화 지방족 히드رو카르빌 기를 지칭한다. 상기 용어는 메틸, 에틸, n-프로필, n-펜틸 등과 같은 기로 예시된다.

[0197] 본원에 사용된 용어 "분지형 알킬"은 3 내지 6개의 탄소 원자를 갖는 1가 포화 분지형 알킬 기를 지칭한다. 상기 용어는 i-부틸, i-프로필, t-부틸 등과 같은 기로 예시된다.

[0198] "시클로 알킬"은, 3 내지 6개의 탄소 원자를 갖고 3개 이상의 탄소 원자가 시클릭 구조를 형성하도록 서로 연결된 알킬 기를 지칭한다. 예시적인 예에는 시클로 프로필, 시클로 부틸, 시클로 펜틸 및 시클로 헥실 기가 포함된다.

[0199] 본원에 사용된 "알콕시알킬"은 하나 이상의 알콕시 기로 치환된 알킬 기를 지칭한다. 달리 기재되지 않는 한, 알콕시알킬 기는 알콕시 기에 10개 이하의 탄소 원자를 포함하고, 알킬 기에 10개 이하의 탄소 원자를 포함한다. 이는 알킬 기를 통하여 염기 분자에 부착된다. 일부 경우에, 이러한 기는 알콕시 기 및/또는 알킬 기에서의 탄소 원자의 수에 따라 기재된다 (예컨대, 예를 들어 C₁₋₆ 알콕시-C₁₋₄-알킬은 1 내지 4개의 탄소 원자

를 갖는 알킬 기를 지칭하며, 이는 C₁-C₆ 알콕시 기로 치환됨). 적합한 알콕시알킬 기에는 메톡시메틸; 메톡시 에틸; 에톡시메틸; 에톡시에틸; 메톡시프로필; 및 메톡시-이소프로필 (2-메톡시-2-프로필)이 포함된다.

[0200] "할로" 또는 "할로겐"은 플루오로, 클로로, 브로모 및/또는 요오도를 지칭하고, 바람직하게는 플루오로 또는 클로로이다.

[0201] 본원에 사용된 "생물학적 활성"은 임의의 실시예 12 내지 14에 기술된 하나 이상의 분석법에서 시험되는 경우의 그리고 이의 하나 이상의 실시예에서 정의된 바와 같은 억제 농도를 지칭한다.

[0202] 본원에 사용된 용어 "제약상 허용되는 염"은 화학식 I 또는 II의 화합물의 무독성 산 염 또는 알칼리 토금속 염을 지칭한다. 이들 염은 화학식 I 또는 II의 화합물의 최종 단리 및 정제 동안, 또는 각각 적합한 유기산 또는 무기산, 또는 유기 염기 또는 무기 염기와 염기 또는 산 관능기를 개별적으로 반응시킴으로써, 동일계내에서 제조될 수 있다. 대표적인 염에는, 이에 제한되지 않지만, 아세테이트, 아디페이트, 알기네이트, 시트레이트, 아스파르테이트, 벤조에이트, 벤젠술포네이트, 바이솔페이트, 부티레이트, 캄포레이트, 캄포르술포네이트, 디글루코네이트, 시클로펜탄프로피오네이트, 도데실술포에이트, 에탄술포네이트, 글루코헵타노에이트, 글리세로포스페이트, 헤미-술포에이트, 헵타노에이트, 헥사노에이트, 푸마레이트, 히드로클로라이드, 히드로브로마이드, 히드로요오다이드, 2-히드록시에탄술포네이트, 락테이트, 말레에이트, 메탄술포네이트, 니코티네이트, 2-나프탈렌술포네이트, 옥살레이트, 과모에이트, 펙티네이트, 페르술포에이트, 3-페닐프로피오네이트, 피크레이트, 피발레이트, 프로피오네이트, 숙시네이트, 술포에이트, 타르트레이트, 티오시아네이트, p-톨루엔술포네이트 및 운테카노에이트가 포함된다. 또한, 염기성 질소-함유 기는 상기 작용제, 예컨대 알킬 할라이드, 예컨대 메틸, 에틸, 프로필 및 부틸 클로라이드, 브로마이드 및 요오다이드; 디알킬 술포에이트, 예컨대 디메틸, 디에틸, 디부틸 및 디아밀 술포에이트, 장쇄 할라이드, 예컨대 테실, 라우릴, 미리스틸 및 스테아릴 클로라이드, 브로마이드 및 요오다이드, 아르알킬 할라이드, 예컨대 벤질 및 페닐 브로마이드 등을 사용하여 4차화될 수 있다. 수용성 또는 지용성 또는 수분산성 또는 유분산성 생성물이 이에 따라 얻어진다.

[0203] 제약상 허용되는 산 부가염을 형성하기 위해 사용될 수 있는 산의 예에는, 무기산, 예컨대 염산, 황산 및 인산, 및 유기산, 예컨대 옥살산, 말레산, 메탄술포산, 숙신산 및 시트르산이 포함된다. 염기 부가염은 화학식 I 또는 II의 화합물의 최종 단리 및 정제 동안, 또는 카르복실산 잔기를 적합한 염기, 예컨대 제약상 허용되는 금속 양이온의 히드록시드, 카르보네이트 또는 바이카르보네이트, 또는 암모니아, 또는 유기 1차, 2차 또는 3차 아민과 개별적으로 반응시킴으로써, 동일계내에서 제조될 수 있다. 제약상 허용되는 염에는, 이에 제한되지 않지만, 알칼리 및 알칼리 토금속을 기초로 하는 양이온, 예컨대 나트륨, 리튬, 칼륨, 칼슘, 마그네슘, 알루미늄 염 등, 뿐만 아니라 암모늄, 4차 암모늄, 및 아민 양이온, 예컨대 이에 제한되지 않지만, 암모늄, 테트라메틸암모늄, 테트라에틸암모늄, 메틸아민, 디메틸아민, 트리메틸아민, 트리에틸아민, 에틸아민 등이 포함된다. 염기 부가염의 형성을 위해 유용한 다른 대표적인 유기 아민에는 디에틸아민, 에틸렌디아민, 에탄올아민, 디에탄올아민, 피페라진 등이 포함된다.

[0204] 본원에 사용된 용어 "제약상 허용되는 에스테르"는 생체내 가수분해되는 에스테르를 지칭하고, 여기에는 인체내에서 분해되어 모 화합물, 이의 염 또는 제약상 활성인 대사물질을 방출하는 것들이 포함된다. 적합한 에스테르 기에는, 예를 들어 제약상 허용되는 지방족 카르복실산, 특히 알칸산, 알켄산, 시클로알칸산 및 알칸디온산으로부터 유래된 것들이 포함되고, 여기서 각각의 알킬 또는 알케닐 잔기는 6개 이하의 탄소 원자를 갖는 것이 유리하다. 특정 에스테르의 대표적인 예에는, 이에 제한되지 않지만, 포르메이트, 아세테이트, 프로피오네이트, 부티레이트, 아크릴레이트 및 에틸숙시네이트가 포함된다.

[0205] 본원에 사용된 용어 "제약상 허용되는 전구약물"은 올바른 의학적 판단의 관점 내에서, 과도한 독성, 자극, 알러지성 반응 등 없이 인간 및 하급 동물의 조직과의 접촉에 사용하기에 적합하고, 합당한 이익/위험 비율에 적당하고, 이들의 의도된 용도 뿐만 아니라 가능하다면 본 발명의 화합물의 양쪽성 이온 형태를 위해 효과적인 본 발명의 화합물의 전구약물을 지칭한다. 용어 "전구약물"은, 빠르게 생체내 전환되어 모 화합물 또는 예를 들어 혈중 가수분해에 의한 상기 화학식의 제약상 활성인 대사물질을 제공하는 화합물을 지칭한다. 이러한 논의는 문헌 [T. Higuchi and V. Stella, Pro-drugs as Novel Delivery Systems, Vol. 14 of the A.C.S. Symposium Series] 및 [Edward B. Roche, ed., Bioreversible Carriers in Drug Design, American Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 1987]에 제공되고, 이들 둘다는 본원에 참고로 포함된다.

[0206] 본원에 사용된 "항암제" 또는 "암 치료용 작용제"는, 예로써 단지, 아포토시스(apoptosis)를 유도하는 작용제; 폴리뉴클레오티드 (예를 들어, 리보자임); 폴리펩티드 (예를 들어, 효소); 약물; 생물학적 모방제; 알칼로이드; 알킬화제; 항종양 항생제; 항대사물질; 호르몬; 백금 화합물; 항암 약물, 독성 및/또는 방사성핵종과 접합된 모

노클로날 항체; 생물학적 반응 조절제 (예를 들어, 인터페론 및 인터류킨 등); 입양 면역요법제; 조절 성장 인자; 종양 세포 분화를 유도하는 작용제 (예를 들어, 모든-트랜스-레티노산 등); 유전자 요법 시약; 안티센스 요법 시약 및 뉴클레오티드; 종양 백신; 혈관신생 억제제 등을 포함하는 작용제를 지칭한다. 다수의 기타 작용제는 당업자의 범주 내에 있다.

[0207] 상기 정의된 모든 치환된 기에서, 그 자체에 추가의 치환기를 갖는 치환기를 한정함으로써 도달하는 중합체는 본원에 포함되는 것으로 의도되지 않는다는 것으로 이해된다. 이러한 경우, 이러한 치환기의 최대 수는 3개이다. 예를 들어, 2개의 다른 치환된 아릴 기를 갖는 치환된 아릴 기의 몇몇 치환은 -치환된 아릴-(치환된 아릴)-치환된 아릴로 한정된다.

[0208] 유사하게, 상기 정의는 허용불가능한 치환 패턴 (예를 들어, 에테닐렌계 또는 아세틸렌계 불포화에 대한 알파 위치에 5개의 플루오로 기 또는 히드록시 기로 치환된 메틸)을 포함하는 것으로 의도되지 않는다는 것을 이해한다. 이러한 허용불가능한 치환 패턴은 당업자들에게 널리 공지되어 있다.

[0209] 본 발명의 화합물은 상기 화합물의 하나 이상의 비대칭 또는 키랄 중심의 존재에 의해 입체이성질체화를 나타낼 수 있다. 본 발명은 다양한 입체이성질체 및 이의 혼합물을 예상한다. 본 발명의 특정 화합물은 비대칭적으로 치환된 탄소 원자를 포함한다. 이러한 비대칭적으로 치환된 탄소 원자는, 비대칭적으로 치환된 특정 탄소 원자에서의 입체이성질체의 혼합물 또는 단일 입체이성질체를 포함하는 본 발명의 화합물을 생성할 수 있다. 결과적으로, 본 발명의 화합물의 라세미 혼합물, 부분입체이성질체의 혼합물, 단일 거울상이성질체 및 단일 부분입체이성질체가 본 발명에 포함된다. 본원에 사용된 용어 "S" 및 "R" 배열은 문헌 [IUPAC 1974 "RECOMMENDATIONS FOR SECTION E, FUNDAMENTAL STEREOCHEMISTRY," Pure Appl. Chem. 45:13-30, 1976]에 의해 정의된 바와 같다. 목적하는 거울상이성질체는 당업계에 널리 공지된 방법에 의해 상업적으로 이용가능한 키랄 출발 물질로부터 키랄 합성에 의해 수득될 수 있거나, 또는 공지된 기술을 이용하여 목적하는 거울상 이성질체를 분리함으로써 거울상이성질체의 혼합물로부터 수득될 수 있다.

[0210] 본 발명의 화합물은 또한 기하학적 이성질체화를 나타낼 수 있다. 기하학적 이성질체에는, 알케닐 또는 알케닐렌 잔기를 갖는 본 발명의 화합물의 시스 및 트랜스 형태가 포함된다. 본 발명은 개별 기하학적 이성질체 및 입체이성질체, 및 이들의 혼합물을 포함한다.

[0211] C. 화합물 제조

[0212] 본 발명의 화합물은 하기 일반적인 방법 및 절차를 이용하여 용이하게 이용가능한 출발 물질로부터 제조될 수 있다. 달리 명시하지 않는 한, 출발 물질은 상업적으로 이용가능하고 당업계에 널리 공지되어 있다. 전형적인 또는 바람직한 공정 조건 (즉, 반응 온도, 시간, 반응물의 몰 비율, 용매, 압력)이 주어지는 경우, 다른 공정 조건도 또한 달리 언급되지 않는 한 이용될 수 있음을 알 것이다. 최적의 반응 조건은 사용되는 특정 반응물 또는 용매에 따라 달라질 수 있지만, 이러한 조건은 종래의 최적화 절차에 따라 당업자에 의해 결정될 수 있다.

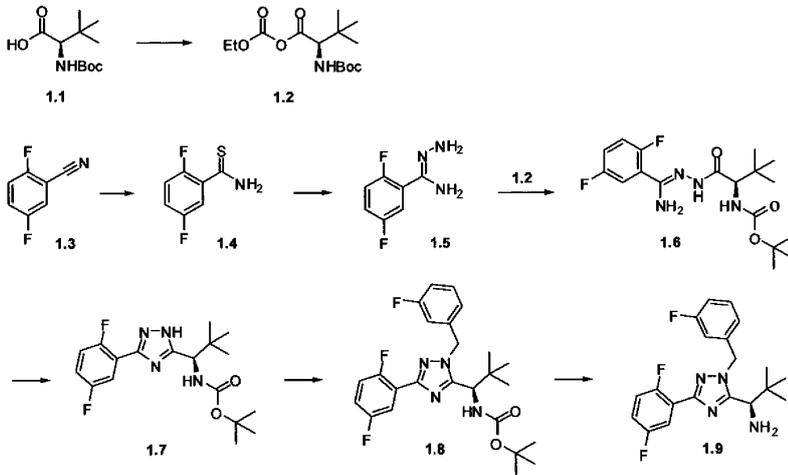
[0213] 추가적으로, 당업자들에게 명백할 바와 같이, 통상의 보호기는 특정 관능기가 목적하지 않은 반응을 경험하는 것을 방지하기 위해 필요할 수 있다. 다양한 관능기를 위한 적합한 보호기 뿐만 아니라, 특정 관능기를 보호하고 탈보호하기 위한 적합한 조건은 당업계에 널리 공지되어 있다. 예를 들어, 다수의 보호기는 문헌 [T. W. Greene 및 P. G. M. Wuts, Protecting Groups in Organic Synthesis, Second Edition, Wiley, New York, 1991] 및 이들에 언급된 참고문헌에 기재되어 있다.

[0214] 추가로, 본 발명의 화합물은 하나 이상의 키랄 중심을 함유할 수 있다. 따라서, 목적하는 경우, 이러한 화합물은 순수한 입체이성질체, 즉 개별 거울상이성질체 또는 부분입체이성질체로서 또는 입체이성질체-풍부 혼합물로서 제조되거나 또는 단리될 수 있다. 이러한 모든 입체이성질체 (및 풍부 혼합물)는 달리 명시하지 않는 한 본 발명의 범주 내에 포함된다. 순수한 입체이성질체 (또는 풍부 혼합물)는, 예를 들어 광학 활성의 출발 물질 또는 당업계에 널리 공지된 입체선택적 시약을 사용하여 제조될 수 있다. 별법으로, 상기 화합물의 라세미 혼합물은, 예를 들어 키랄 컬럼 크로마토그래피, 키랄 분할제 등을 사용하여 분리될 수 있다.

[0215] 본 발명의 화합물은, 당업계에 공지되어 있으며 본원에 추가로 기재된 방법에 의해 제조될 수 있다. 예를 들어, 화학식 I의 화합물의 제조 방법은 공개 출원 PCT/US2007/084154 (WO 2008/063912)에 기재되어 있다. 화학식 I의 화합물의 제조에 적용가능한 추가적인 합성 방법의 예는 본원에 제공된다.

[0216] 화학식 I의 특정 KSP 억제제의 제조에 대한 한 예를 하기 반응식 1에 나타내었다.

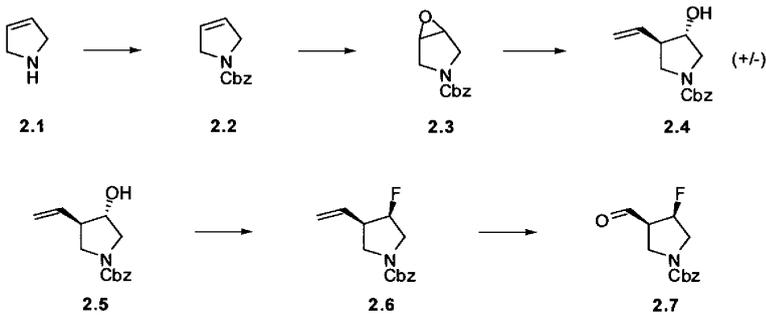
[0217] <반응식 1>



[0218]

[0219] 부틸글리신 (1.1)을 에틸 클로로포르메이트로 처리하여, 혼합된 무수물 (1.2)를 형성하였다. 벤조니트릴 (1.3)을 암모늄 술파이드로 처리하여 티오아미드 (1.4)를 형성한 다음, 이를 히드라진으로 처리하여 화학식 (1.5)의 히드라지드를 형성하였다. 히드라지드 (1.5)를 (1.2) 및 트리에틸아민과 반응시켜, 카르바메이트 (1.6)을 수득하였다. 이어서, 카르바메이트 (1.6)을 자일렌 중 암모늄 아세테이트 (NH₄OAc)로 환류시켜, 트리아졸 (1.7)을 수득하였다. 디메틸포름아미드 중에서 (1.7)을 플루오르화된 벤질 브로마이드 ((2-플루오로페닐)메틸 브로마이드 또는 (3-플루오로페닐)메틸 브로마이드) 및 Cs₂CO₃와 반응시켜, 이의 위치이성질체(regioisomer)를 포함하는 (1.8)을 수득하였다 (컬럼 크로마토그래피로부터 분리됨). (1.8)을 트리플루오로아세트산으로 처리하여 (1.8)의 TFA 염을 제공하며, 이는 이어서 NaOH / 메탄올 용액으로 적정되는 경우, 이의 유리 염기로 전환될 수 있다. 플루오르화된 벤질 브로마이드보다는 벤질브로마이드를 사용하는 유사한 제조에서, (1.1) 및 (1.3)으로부터 (1.8)이 고수율 및 고순도 (HPLC로 측정하는 경우 >97%) 및 광학 고순도 (>99% e.e.)로 형성된다.

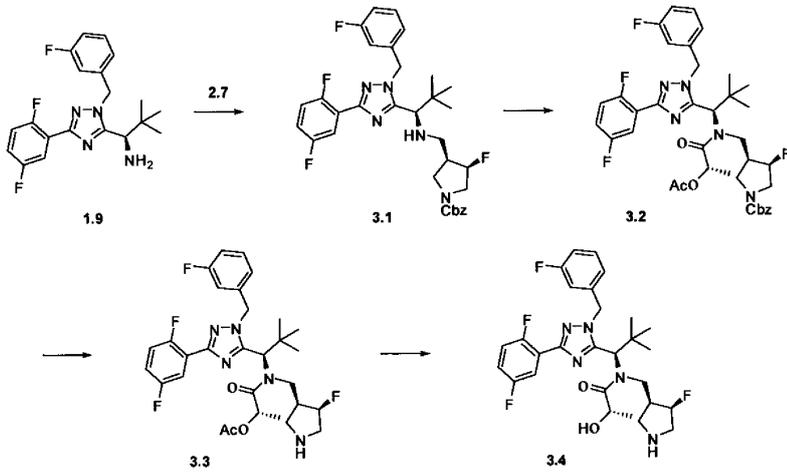
[0220] <반응식 2>



[0221] 단일 거울상이성질체

[0222] 화합물 (1.9)를 환원성 아미노화 조건하에서 알데히드 (2.7)과 반응시켜 2차 아민 (3.1)을 수득할 수 있으며, 이어서 이를 아실화하여 화학식 I의 화합물을 제공할 수 있다. 반응식 2는 화학식 I의 화합물, 특히 화학식 Ia의 화합물을 제조하기 위한 환원성 아미노화 단계에서 사용될 수 있는 알데히드 (2.7)의 제조를 예시하고 있다. 시클릭 아민 (2.1)을 Cbz 기로 보호하여, 화합물 (2.2)를 수득하였다. 화합물 (2.2)의 MCPBA 에폭시화로부터 에폭시드 (2.3)을 수득하였다. 에폭시드는 비닐마그네슘 브로마이드 및 구리 브로마이드의 반응에 의해 알콜의 라세미 혼합물 (2.4)을 제공하였다. 키랄 컬럼 크로마토그래피에 의해 알콜 (2.5)를 단일 거울상이성질체로서 수득하였다. 알콜 (2.5)를 플루오르화 조건에 노출시켜, 비닐 플루오로피롤리딘 (2.6)을 수득하였다. 비닐 플루오로피롤리딘 (2.6)은 후속적으로 디히드록실화/산화성 절단을 겪어, 알데히드 (2.7)을 제공한다.

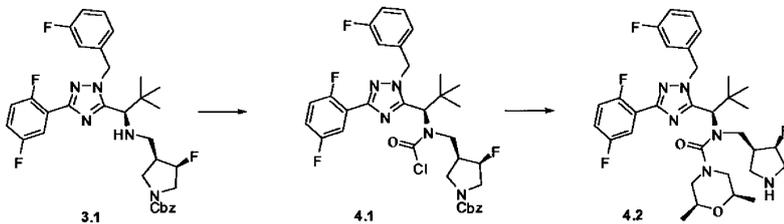
[0223] <반응식 3>



[0224]

[0225] 플루오로피롤리딘 잔기의 부착 후, 공지된 아실화제 및 아실화 조건을 사용하여 비환식 아민을 아실화시켜 화학식 I의 화합물을 제공한 후, 피롤리딘 고리의 질소 상의 보호기 및/또는 아실레이트 잔기의 보호기를 탈보호하였다. 반응식 3은 2차 아민 (3.1)을 제공하기 위한 환원성 아미노화를 예시하고 있다. 아민 (3.1)의 아실화에 이은 Cbz 기의 탈보호 및 유리 히드록실 기 상의 보호기의 제거로, 화합물 (3.4)가 제공된다. 피롤리딘 고리 질소를 위한 적합한 보호기에는, 예를 들어 가수소분해에 의해 제거될 수 있는 벤질 카르바메이트, 및 트리메틸실릴 요오다이드 또는 산과 같은 시약을 이용하여 선택적으로 제거될 수 있는 t-부틸 카르바메이트가 있다.

[0226] <반응식 4>



[0227]

[0228] 반응식 4는 2차 아민 (3.1)로부터의 우레아 형성에 대한 일반적인 설명을 나타낸다. 2차 아민 (3.1)을 포스겐 또는 트리포스겐과 반응시켜 클로로 화합물 (4.1)을 수득하고, 이를 바로 아민과 반응시켜 화학식 I의 우레아 화합물을 수득한 후, 피롤리딘 고리의 질소 상의 보호기를 탈보호하였다. 반응식 4는, 2차 아민 (3.1)을 클로로 카르보닐화하여 화합물 (4.1)을 수득하여, 이를 즉시 모르폴린과 반응시킨 다음, Cbz 기를 제거하여 화합물 (4.2)를 수득하는 것을 예시하고 있다.

[0229] 이러한 분자에서의 키랄 중심의 절대 입체화학적성은 공지되어 있는 출발 물질 또는 중간체의 키랄성을 기초로 확인된다는 것을 주목해야 한다. HPLC 및 nmr 데이터는, 상기의 과정이 상기 화합물을 단일 이성질체로서 제공한다는 결론을 지지한다.

[0230] 아실화 단계를 위한 적합한 아실화제 및 산에는 아실 할라이드, 무수물 및 적절한 구조식 (화학식 I 참조)을 갖는 산이 포함된다. 적합한 amid 커플링 조건은, amid 결합을 형성하는 다양한 amid 커플링 시약, 예컨대 카르보디이미드 N-N'-디시클로헥실카르보디이미드 (DCC), N-N'-디이소프로필카르보디이미드 (DIPCDI) 및 1-에틸-3-(3'-디메틸아미노프로필)카르보디이미드 (EDCI)의 사용을 포함한다. 카르보디이미드는 첨가제, 예컨대 디메틸아미노피리딘 (DMAP) 또는 벤조트리아졸, 예컨대 7-아자-1-히드록시벤조트리아졸 (HOAt), 1-히드록시벤조트리아졸 (HOBt) 및 6-클로로-1-히드록시벤조트리아졸 (Cl-HOBt)과 함께 사용될 수 있으며, 상기의 amid 결합 형성을 위한 조건은 당업계에 널리 공지되어 있다.

[0231] 추가적인 amid 커플링 시약은 또한 아미늄 및 포스포늄 기체 시약을 포함한다. 아미늄 염에는 N-[(디메틸아미노)-1H-1,2,3-트리아졸로[4,5-b]피리딘-1-일메틸렌]-N-메틸메탄아미늄 헥사플루오로포스페이트-N-옥시드 (HATU), N-[(1H-벤조트리아졸-1-일)(디메틸아미노)메틸렌]-N-메틸메탄아미늄 헥사플루오로포스페이트-N-옥시드 (HBTU), N-[(1H-6-클로로벤조트리아졸-1-일)(디메틸아미노)메틸렌]-N-메틸메탄아미늄 헥사플루오로포스페이트-N-옥시드 (HCTU), N-[(1H-벤조트리아졸-1-일)(디메틸아미노)메틸렌]-N-메틸메탄아미늄 테트라플루오로보레이트

N-옥시드 (TBTU) 및 N-[(1H-6-클로로벤조트리아졸-1-일)(디메틸아미노)메틸렌]-N-메틸메탄아미늄 테트라플루오로보레이트 N-옥시드 (TCTU)가 포함된다. 포스포늄 염에는 벤조트리아졸-1-일-옥시-트리스-(디메틸아미노)-포스포늄 헥사플루오로포스페이트 (BOP), 7-아자벤조트리아졸-1-일-N-옥시-트리스(피롤리디노)포스포늄 헥사플루오로포스페이트 (PyAOP) 및 벤조트리아졸-1-일-N-옥시-트리스(피롤리디노)포스포늄 헥사플루오로포스페이트 (PyBOP)가 포함된다.

- [0232] 아미드 형성 단계는 디메틸포름아미드 (DMF)와 같은 극성 용매에서 수행될 수 있고, 또한 유기 염기, 예컨대 디이소프로필에틸아민 (DIEA) 또는 디메틸아미노피리딘 (DMAP)을 포함할 수 있다.
- [0233] 표 1의 하기 화합물은 상기 기술된 방법 중 하나를 사용하여 제조하였다. 또한, 표 1은 다양한 실시예에 대한 IC50 값을 제공한다.
- [0234] D. 제약 제제
- [0235] 제약으로서 사용하는 경우, 본 발명의 화합물은 보통 제약 조성물의 형태로 투여된다. 이들 조성물은 경구, 비경구, 경피, 국소, 직장 및 비내를 비롯한 다양한 경로로 투여될 수 있다. 이들 화합물은, 예를 들어 주사가 가능한 조성물 및 경구 조성물로서 둘다 효과적이다. 이러한 조성물은 제약 분야에 널리 공지된 방식으로 제조되고, 하나 이상의 활성 화합물을 포함한다.
- [0236] 본 발명은 또한 활성 성분으로서 하나 이상의 상기 본 발명의 화합물을 제약상 허용되는 담체와 함께 함유하는 제약 조성물을 포함한다. 본 발명의 조성물을 제조하는 데 있어서, 활성 성분은 보통 부형제와 혼합되거나, 부형제에 의해 희석되거나, 또는 캡슐제, 사체제, 지체 또는 기타 용기의 형태일 수 있는 이러한 담체 내에 봉입된다. 사용된 부형제는 전형적으로 인간 대상체 또는 기타 포유류로의 투여를 위해 적합한 부형제이다. 상기 부형제가 희석제로서 작용하는 경우, 이는 활성 성분을 위해 비히킬, 담체 또는 매질로서 작용하는 고품, 반고형 또는 액상 물질일 수 있다. 따라서, 이러한 조성물은 정제, 환제, 산제, 로젠지제, 사체제, 카세제, 엘릭시르, 현탁액제, 유액제, 용액제, 시럽제, 에어로졸 (고체로서의 에어로졸 또는 액상 매질 중의 에어로졸), 예를 들어 10 중량% 이하의 활성 화합물을 함유한 연고제, 연질 및 경질 젤라틴 캡슐제, 좌제, 멸균 주사용 용액제, 및 멸균 패키징된 산제 형태일 수 있다.
- [0237] 제제의 제조에 있어서, 활성 화합물을 분쇄하여 적절한 입도를 얻은 후에 다른 성분과 조합되는 것이 필요할 수 있다. 활성 화합물이 실질적으로 불용성인 경우, 이것을 통상적으로 200 메쉬 미만의 입도로 분쇄한다. 활성 화합물이 실질적으로 수용성인 경우, 보통 분쇄함으로써 입도를 적절하게 하여, 예를 들어 약 40 메쉬가 되게 하여 제제 중에서 실질적으로 균일한 분포를 제공한다.
- [0238] 적절한 부형제의 일부 예에는, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 소르비톨, 만니톨, 전분, 아카시아검, 인산칼슘, 알기네이트, 트래거캔스, 젤라틴, 칼슘 실리케이트, 미세결정질 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 멸균수, 시럽 및 메틸 셀룰로스가 포함된다. 상기 제제는 추가로 활제, 예컨대 활석, 마그네슘 스테아레이트 및 광물 오일; 습윤제; 유화제 및 현탁화제; 보존제, 예컨대 메틸- 및 프로필히드록시-벤조에이트; 감미제; 및 향미제를 포함한다. 본 발명의 조성물은 당업계에 공지된 절차를 이용하여 환자에게 투여한 후 활성 성분의 신속 방출, 지속 방출 또는 지연 방출을 제공하도록 제제화될 수 있다.
- [0239] 제약 조성물 및 이의 단위 투여 형태 중의 본 발명에 따른 화합물인 활성 성분의 양은 특정 적용, 특정 화합물의 효능 및 목적 농도에 따라 달라질 수 있거나 광범위하게 조정될 수 있다.
- [0240] 상기 조성물은 바람직하게는 단위 투여 형태로 제제화될 수 있고, 각각의 투여형은 약 1 내지 약 500 mg, 보통 약 5 내지 약 100 mg, 때때로 약 10 내지 약 30 mg의 활성 성분을 함유할 수 있다. 용어 "단위 투여 형태"는 인간 대상체 및 기타 포유류를 위한 단위 투여형으로서 적합한 물리적으로 분리된 단위를 지칭하고, 각각의 단위는 목적하는 치료 효과를 생성하기 위해 계산된 예정된 양의 활성 물질을 적합한 제약 부형제와 함께 함유한다. 바람직하게는, 상기 본 발명의 화합물은 제약 조성물의 약 20 중량% 이하, 보다 바람직하게는 약 15 중량% 이하로 사용되며, 나머지 분량은 제약상 불활성 담체(들)가 차지한다.
- [0241] 활성 화합물은 광범위한 투여량 범위에 걸쳐 효과적이고, 보통 제약상 또는 치료상 유효량으로 투여된다. 하지만, 실제로 투여되는 화합물의 양은 치료하고자 하는 상태, 치료하고자 하는 상태의 심각도, 선택된 투여 경로, 투여된 실제 화합물, 개별 환자의 연령, 체중 및 반응, 환자 증상의 심각도 등을 비롯한 관련 환경의 관점에서 의사에 의해 결정될 것임을 이해할 것이다.
- [0242] 포유류에서 암을 치료하거나 또는 암과 싸우기 위한 치료 용도에서, 상기 화합물 또는 이의 제약 조성물은, 치

료를 경험하는 포유류에서 치료상 효과적일 것인 활성 성분의 양 또는 혈중-수준인 농도를 얻고 유지하기 위한 투여량으로, 임의의 적절한 경로에 의해, 예컨대 경구로, 국소적으로, 경피적으로 및/또는 비경구적으로 투여될 것이다. 일반적으로, 활성 성분의 이러한 치료 유효량의 투여량 (즉, 유효 투여량)은 약 0.1 내지 약 100, 보다 바람직하게는 약 1.0 내지 약 50 mg/체중 kg/일의 범위일 것이다.

[0243] 정제와 같은 고형 조성물을 제조하기 위해, 주요 활성 성분은 제약 부형제와 혼합되어 본 발명의 화합물의 균질 혼합물을 함유한 예비 고형 제제 조성물을 형성한다. 이러한 예비 제제 조성물이 균질한 것으로서 지칭되는 경우, 이는 활성 성분이 조성물에 고르게 분포되어 있어서 상기 조성물이 정제, 환제 및 캡슐제와 같은 동일한 유효 단위 투여 형태로 용이하게 세분될 수 있음을 의미한다. 이어서, 이러한 예비 고형 제제는, 예를 들어 0.1 내지 약 500 mg의 본 발명의 활성 성분을 함유한 상기 기재된 유형의 단위 투여 형태로 세분된다.

[0244] 본 발명의 정제 또는 환제는 장기적 작용의 이익을 공급하는 투여 형태를 제공하도록 코팅되거나 또는 다르게는 배합될 수 있다. 예를 들어, 정제 또는 환제는 내부 투여 성분 및 외부 투여 성분을 포함할 수 있고, 외부 투여 성분은 내부 투여 성분 상의 외피의 형태일 수 있다. 2가지 성분은 장용 층에 의해 분리될 수 있으며, 이러한 장용 층은, 위에서 분해를 방지하거나, 내부 성분이 십이지장 내로 완전한 상태로 통과하도록 허용하거나, 또는 방출 시 지연되도록 작용한다. 다양한 물질이 장용 층 또는 코팅을 위해 사용될 수 있고, 이러한 물질에는 다수의 고분자산, 및 셀락, 세틸 알콜 및 셀룰로스 아세테이트와 같은 물질과 고분자산의 혼합물이 포함된다.

[0245] 경구 또는 주사로 투여하기 위해 본 발명의 신규 조성물이 혼입될 수 있는 액상 형태는 수성 용액제, 적합한 향미 시럽제, 수성 또는 유성 현탁액제, 및 식용 오일, 예컨대 옥수수유, 면화씨유, 참깨유, 코코넛유 또는 땅콩유 뿐만 아니라 엘릭시르 및 유사한 제약 비히클과의 향미 유액제를 포함한다.

[0246] 흡입 또는 취입용 조성물에는 제약상 허용되는 수성 용매 또는 유기 용매, 또는 이들의 혼합물 중의 용액제 및 현탁액제, 및 산제가 포함된다. 액상 또는 고형 조성물은 상기 기재된 바와 같은 적합한 제약상 허용되는 부형제를 함유할 수 있다. 바람직하게는 상기 조성물은 국소 또는 전신 효과를 위한 경구 또는 비내 호흡 경로로 투여된다. 바람직하게는 제약상 허용되는 용매 중의 조성물은 불활성 기체를 사용하여 분무될 수 있다. 분무 용액제는 분무 장치로부터 직접 흡입될 수 있거나, 또는 상기 분무 장치는 안면 마스크 텐트(face mask tent) 또는 간헐성 양압 호흡기에 부착될 수 있다. 용액제, 현탁액제 또는 산제 조성물은, 바람직하게는 적절한 방식으로 제제를 전달하는 장치로부터 경구로 또는 비내로 투여될 수 있다.

[0247] 하기 제제 실시예는 본 발명의 대표적인 제약 조성물을 설명한다.

[0248] **제제 실시예 1**

[0249] 하기 성분을 함유한 경질 젤라틴 캡슐제를 제조한다:

성분	정량 (mg/캡슐)
활성 성분	30.0
전분	305.0
마그네슘 스테아레이트	5.0

[0250] 상기 성분들을 혼합하고 경질 젤라틴 캡슐 내에 340 mg의 양으로 채운다.
[0251]

[0252] **제제 실시예 2**

[0253] 정제 제제는 하기 성분을 사용하여 제조한다:

성분	정량 (mg/정제)
활성 성분	25.0
셀룰로스, 미세결정질	200.0
콜로이드성 이산화규소	10.0
스테아르산	5.0

[0254] 상기 성분들을 블렌딩하고 압착하여 각각 중량이 240 mg인 정제를 형성한다.
[0255]

[0256] **제제 실시예 3**

[0257] 건식 분말 흡입 제제는 하기 성분을 함유하여 제조된다:

성분	중량%
활성 성분	5
락토스	95

[0258] 상기 활성 성분을 락토스와 혼합하고, 혼합물을 건식 분말 흡입 장치에 첨가한다.
 [0259] 제제 실시예 4

[0260] 제제 실시예 4

[0261] 각각 30 mg의 활성 성분을 함유한 정제를 하기와 같이 제조한다:

성분	정량 (mg/정제)
활성 성분	30.0 mg
전분	45.0 mg
미세결정질 셀룰로스	35.0 mg
폴리비닐피롤리돈 (평균수 중 10% 용액)	4.0 mg
나트륨 카르복시메틸 전분	4.5 mg
마그네슘 스테아레이트	0.5 mg
활석	1.0 mg
총량	120 mg

[0262] 활성 성분, 전분 및 셀룰로스를 No. 20 메쉬 U.S. 체를 통해 통과시키고 철저하게 혼합한다. 폴리비닐피롤리돈의 용액을 생성된 분말과 혼합한 다음, 이것을 16 메쉬 U.S. 체를 통해 통과시킨다. 이렇게 생성된 과립을 50 °C 내지 60°C에서 건조시키고, 16 메쉬 U.S. 체를 통해 통과시킨다. 이어서, No. 30 메쉬 U.S. 체를 통해 통과시킨 후에, 나트륨 카르복시메틸 전분, 마그네슘 스테아레이트 및 활석을 상기 과립에 첨가하고, 혼합 후에 이것을 정제화 기기 상에서 압축하여 각각 중량이 120 mg인 정제를 수득한다.

[0264] 제제 실시예 5

[0265] 각각 약제 40 mg을 함유한 캡슐을 하기와 같이 제조한다:

성분	정량 (mg/캡슐)
활성 성분	40.0 mg
전분	109.0 mg
마그네슘 스테아레이트	1.0 mg
총량	150.0 mg

[0266] 활성 성분, 전분 및 마그네슘 스테아레이트를 블렌딩하고, No. 20 메쉬 U.S. 체를 통해 통과시키고, 150 mg 양으로 경질 젤라틴 캡슐 내에 채운다.

[0268] 제제 실시예 6

[0269] 각각 25 mg의 활성 성분을 함유한 좌제를 하기와 같이 제조한다:

성분	양
활성 성분	25 mg
포화 지방산 글리세리드	2,000 mg까지

[0270] 활성 성분을 No. 60 메쉬 U.S. 체를 통해 통과시키고, 포화 지방산 글리세리드 중에 현탁시킨 후, 필요한 최소 가열을 이용하여 용융시킨다. 이어서, 혼합물을 공칭 용량 2.0 g의 좌제 주형 내에 붓고 냉각시킨다.

[0272] 제제 실시예 7

[0273] 5.0 mL 용량 당 각각 50 mg의 약제를 함유한 현탁액제를 하기와 같이 제조한다:

성분	양
활성 성분	50.0 mg
크산탄검	4.0 mg
나트륨카르복시메틸 셀룰로스 (11%) /미세결정질 셀룰로스 (89%)	50.0 mg
수크로스	1.75 g
나트륨 벤조에이트	10.0 mg
향미제 및 착색제	q.v.
정제수	5.0 mL까지

[0274]

[0275] 활성 성분, 수크로스 및 크산탄 검을 블렌딩하고, No. 10 메시 U.S. 체를 통해 통과시킨 다음, 물 중의 미세결정질 셀룰로스와 나트륨 카르복시메틸 셀룰로스의 미리 제조된 용액과 혼합한다. 나트륨 벤조에이트, 향미제 및 착색제는 약간의 물로 희석시키고 교반하면서 첨가한다. 이어서, 충분한 물을 첨가하여 필요한 부피를 생성한다.

[0276] 제제 실시예 8

성분	정량 (mg/캡슐)
활성 성분	15.0 mg
전분	407.0 mg
마그네슘 스테아레이트	3.0 mg
총량	425.0 mg

[0277]

[0278] 활성 성분, 전분 및 마그네슘 스테아레이트를 블렌딩하고, No. 20 메시 U.S. 체를 통해 통과시키고, 425.0 mg의 양으로 경질 젤라틴 캡슐 내에 채운다.

[0279] 제제 실시예 9

[0280] 피하 제제는 하기와 같이 제조될 수 있다:

성분	정량
활성 성분	5.0 mg
옥수수유	1.0 mL

[0281]

[0282] 제제 실시예 10

[0283] 국소 제제는 하기와 같이 제조될 수 있다:

성분	정량
활성 성분	1-10 g
유화용 왁스	30 g
액상 파라핀	20 g
백색 연질 파라핀	100 g까지

[0284]

[0285] 백색 연질 파라핀이 용융될 때까지 이것을 가열한다. 액상 파라핀 및 유화용 왁스를 혼입하고, 용해될 때까지 교반한다. 활성 성분을 첨가하고, 분산될 때까지 계속 교반한다. 이어서, 혼합물이 고체화될 때까지 냉각시킨다.

[0286] 제제 실시예 11

[0287] 정맥내 제제의 예시적 예는 하기와 같이 제조될 수 있다:

성분	정량
활성 성분	250 mg
등장성 염수	1000 mL

[0288]

[0289] 본 발명의 방법에서 사용된 또다른 바람직한 제제는 경피 전달 장치 ("패치")를 사용한다. 이러한 경피 패치는 제어된 양의 본 발명의 화합물의 연속적 또는 불연속적 취입을 제공하기 위해 사용될 수 있다. 제약 작용제의 전달을 위한 경피 패치의 구성 및 사용은 당업계에 널리 공지되어 있다. 예를 들어, 본원에 참조로 포함되는 미국 특허 제5,023,252호 (1991년 6월 11일에 특허허여됨)를 참조한다. 이러한 패치는 제약 작용제의 연속적, 박동성 또는 요구성 전달을 위해 구성될 수 있다.

[0290] 종종, 제약 조성물을 뇌에 직간접적으로 도입하는 것이 바람직하거나 필요할 것이다. 직접적인 기술은 보통 속

주의 심실계 내로 약물 전달 카테터를 배치하여 혈액-뇌 방벽을 우회하는 것을 포함한다. 신체의 특정 해부학 상 영역에 생물학적 요소를 전달하기 위해 사용되는 이러한 하나의 이식형 전달계는 본원에 참조로 포함되는 미국 특허 제5,011,472호에 기재되어 있다.

- [0291] 일반적으로 바람직한 간접적인 기술은 보통 친수성 약물을 지질-가용성 약물로 전환시킴으로써 약물 잠복과정 동안 제공하도록 조성물을 제제화하는 것을 포함한다. 잠복과정은 보통 약물 상에 존재하는 히드록시, 카르보닐, 술페이트 및 1차 아민 기를 차단하는 것을 통해 달성되며, 상기 약물이 더 지질 가용성이 되게 하고 혈액-뇌 방벽을 가로질러 수송될 수 있도록 한다. 다르게는, 친수성 약물의 전달은 혈액-뇌 방벽을 일시적으로 개방할 수 있는 고장성 용액의 동맥내 주입에 의해 향상될 수 있다.
- [0292] 본 발명에서 사용하기 위한 다른 적합한 제제는 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Philadelphia, PA, 17th ed. (1985)]에서 발견될 수 있다.
- [0293] E. 투여량 및 투여
- [0294] 상기 언급된 바와 같이, 본원에 기재된 화합물은 상기 기재된 다양한 약물 전달계에 사용하기에 적합하다. 추가적으로, 투여된 화합물의 생체내 혈장 반감기를 향상시키기 위해, 상기 화합물을 캡슐화시키거나 리포솜의 루멘 내로 도입하거나 콜로이드로서 제조할 수 있거나 또는 화합물의 연장된 혈장 반감기를 제공하는 기타 통상의 기술을 이용할 수 있다. 다양한 방법은, 예를 들어 스조카 등(Szoka, et al.)의 미국 특허 제4,235,871호, 제4,501,728호 및 제4,837,028호 (이들 각각은 본원에 참고로 포함됨)에 기재된 바와 같이 리포솜을 제조하기 위해 이용가능하다.
- [0295] 본 발명의 화합물은 적어도 부분적으로는 KSP의 활성화에 의해 매개되는 장애를 억제하거나 또는 치료하기 위해 유용하다. 한 측면에서, 적어도 부분적으로 KSP에 의해 매개되는 장애는 세포 증식 장애이다. 용어 "세포성 증식 장애" 또는 "세포 증식 장애"는, 예를 들어 암, 종양, 과형성, 재협착, 심장 비대, 면역 장애 및 염증을 비롯한 질환을 지칭한다. 본 발명은 치료 유효량의 화학식 I 또는 II의 화합물을 단독으로 또는 기타 항암제와 조합으로 인간 대상체 또는 포유류 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 상기 치료를 필요로 하는 인간 대상체 또는 포유류 대상체를 치료하는 방법을 제공한다.
- [0296] 본 발명의 화합물은 암 세포의 성장을 시험관내 또는 생체내 억제하는 데 유용하다. 용어 "암"은, 예를 들어 폐암 및 기관지암; 전립선암; 유방암; 췌장암; 결장암 및 직장암; 갑상선암; 위암; 간암 및 간내담관암; 신장암 및 신우암; 방광암; 자궁체부암; 자궁경부암; 난소암; 다발성 골수종; 식도암; 급성 골수양 백혈병; 만성 골수양 백혈병; 림프구성 백혈병; 골수양 백혈병; 뇌암; 구강암 및 인두암; 후두암; 소장암; 비-호지킨 림프종; 흑색종; 및 결장 용모 선종을 비롯한 암 질환을 지칭한다.
- [0297] 암에는 또한 암종, 선암종, 육종 및 혈액학적 악성종양으로 이루어진 군으로부터 선택된, 종양 또는 신생물이 포함된다.
- [0298] 추가적으로, 암의 유형은 고형 종양/악성종양의 성장, 점액성 및 원형 세포 암종, 국부 진행성 종양, 인간 연조직 암종, 암 전이, 편평 세포 암종, 식도 편평 세포 암종, 경구 암종, 피부 T 세포 림프종, 호지킨 림프종, 비-호지킨 림프종, 부신 피질 암, ACTH-생성 종양, 비-소세포암, 유방암, 위장암, 비뇨기암, 여성 생식기의 악성종양, 남성 생식기의 악성종양, 신장암, 뇌암, 골암, 피부암, 갑상선암, 망막아종, 신경아세포종, 복막 삼출, 악성 가슴막 삼출, 중피종, 빌름스 종양(Wilms's tumor), 담낭암, 영양아충성 신생물, 혈관주피종 및 카포시 육종(Kaposi's sarcoma)으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0299] 본 발명의 화합물 또는 조성물은 적합한 경로에 의해, 예컨대 경구로, 정맥내로, 비경구적으로, 경피로, 국소적으로, 직장으로 또는 비내로 포유류에게 투여될 수 있다.
- [0300] 포유류에는, 예를 들어 인간 및 기타 영장류, 가축 또는 반려 동물, 예컨대 개 및 고양이, 실험실 동물, 예컨대 래트, 마우스 및 래빗, 및 농장 동물, 예컨대 말, 돼지, 양 및 소가 포함된다.
- [0301] 종양 또는 신생물은 세포 증가가 비제어적이고 진행적인 조직 세포의 성장을 포함한다. 이러한 일부 성장은 양성이지만, 다른 것은 "악성"이라 지칭되고, 유기체의 죽음을 유도할 수 있다. 악성 신생물 또는 "암"은 공격적인 세포 증식을 나타낸다는 것 이외에도 이들이 주변 세포를 침해하고 이에 전이될 수 있다는 점에서 양성 성장과 구분된다. 게다가, 악성 신생물은 이들이 다른 것에 비해 그리고 주변 조직에 비해 더 큰 분화 손실 (더 큰 "탈분화") 및 조직화를 나타낸다는 점을 특징으로 한다. 이러한 성질은 "퇴화"라고 지칭한다.
- [0302] 목적하는 생물학적 활성을 갖는 화합물은 개선된 약리학적 성질 (예를 들어, 생체내 안정성, 생체-이용성) 또는

진단 적용에서 검출되는 능력과 같은 목적하는 성질을 제공하기 위해 필요에 따라 변형될 수 있다. 안정성은 펩티다제 또는 인간 혈장 또는 혈청과 함께 인큐베이션하는 동안 화합물의 반감기를 측정하는 것과 같은 다양한 방법으로 분석될 수 있다.

- [0303] 진단 목적을 위해, 검출가능한 신호를 직간접적으로 제공할 수 있는 매우 다양한 표지가 상기 화합물에 연결될 수 있다. 따라서, 본 발명의 화합물 및/또는 조성물은 생물학적 활성을 여전히 유지하는 동안 다양한 최종 목적을 위해 다양한 방법으로 변형될 수 있다. 추가로, 다양한 반응 부위는 입자, 고체 기질, 거대분자 등에 연결하도록 도입될 수 있다.
- [0304] 표지된 화합물은 다양한 생체내 또는 시험관내 적용에 사용될 수 있다. 매우 다양한 표지, 예컨대 방사성핵종 (예를 들어, 감마-방출 방사성동위원소, 예컨대 테크네튬-99 또는 인듐-111), 형광물질 (예를 들어, 플루오레세인), 효소, 효소 기질, 효소 공동 인자, 효소 억제제, 화학발광 화합물, 생체발광 화합물 등이 사용될 수 있다. 당업자들은 착물에 결합시키기에 적합한 기타 표지를 알고 있을 것이거나, 또는 통상의 실험을 이용하여 확인할 수 있을 것이다. 이들 표지의 결합은 당업자들에게 일반적인 표준 기술을 이용하여 달성된다.
- [0305] 본 발명의 제약 조성물은 다양한 약물 전달계에서 사용하기에 적합하다. 본 발명에서 사용하기 위한 적합한 제제는 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences, Mace Publishing Company, Philadelphia, Pa., 17th ed. (1985)]에서 발견된다.
- [0306] 환자에게 투여되는 양은 무엇이 투여되는 지, 투여 목적, 예컨대 예방 또는 치료, 환자의 상태, 투여 방식 등에 따라 달라질 것이다. 치료 적용 시, 조성물은 질환 및 이의 합병증의 진행 및 증상을 치유하거나 또는 적어도 부분적으로 저지하기에 충분한 양으로, 질환으로부터 이미 고통받은 환자에게 투여된다. 이를 달성하기 위해 적절한 양은 "치료상 유효량"으로서 정의된다. 이러한 용도에 효과적인 양은 치료하고자 하는 질환 상태뿐만 아니라 질환, 장애 또는 상태의 심각도, 환자의 연령, 체중 및 일반 상태 등과 같은 인자에 따라 주치의의 판단에 의해 좌우될 것이다.
- [0307] 환자에게 투여되는 화합물은 전형적으로 상기 기재된 제약 조성물의 형태이다. 이러한 조성물은 통상의 멸균 기술에 의해 멸균될 수 있거나 또는 멸균 여과될 수 있다. 생성된 수용액은 그 자체로 사용을 위해 패키징되거나 또는 동결건조될 수 있고, 상기 동결건조된 제제는 투여 전에 멸균 수성 담체와 배합된다. 화합물 제제의 pH는 전형적으로 약 3 내지 11, 보다 바람직하게는 약 5 내지 9 및 가장 바람직하게는 약 7 내지 8일 것이다. 상기 언급된 특정 부형제, 담체 또는 안정화제의 사용은 제약 염을 형성시킬 것임을 이해할 것이다.
- [0308] 본 발명의 화합물 및/또는 조성물의 치료 투여량은, 예를 들어 치료가 이루어지는 특정 용도, 화합물의 투여 방식, 환자의 건강 및 상태, 및 처방 의사의 판단에 따라 달라질 것이다. 예를 들어, 경구 투여를 위해, 용량은 전형적으로 약 5 μg 내지 약 50 mg/체중 kg/일, 바람직하게는 약 1 mg 내지 약 10 mg/체중 kg/일일 것이다. 다르게는, 정맥내 투여를 위해, 용량은 전형적으로 약 5 μg 내지 약 50 mg/체중 kg, 바람직하게는 약 500 μg 내지 약 5000 μg /체중 kg일 것이다. 예상되는 별법의 투여 경로에는, 이에 제한되지 않지만, 비내, 경피, 흡입, 피하 및 근육내가 포함된다. 효과적인 용량은 시험관내 또는 동물 모델 시험 시스템으로부터 유래된 용량-반응 곡선으로부터 추정될 수 있다.
- [0309] 일반적으로, 본 발명의 화합물 및/또는 조성물은 유사한 유용성을 제공하는 작용제에 대해 허용되는 임의의 투여 방식에 의해 치료 유효량으로 투여될 것이다. 이러한 화합물의 독성 및 치료 효능은, 예를 들어 LD₅₀ (집단 50%에 대한 치사 용량) 및 ED₅₀ (집단 50%에 대한 치료 유효량)을 측정하기 위한 세포 배양 또는 실험 동물에서 표준 제약 절차에 의해 측정될 수 있다. 독성 효과와 치료 효과 사이의 용량 비율은 치료 지수이고, 이것은 LD₅₀/ED₅₀의 비율로서 표현될 수 있다. 치료 지수가 큰 화합물이 바람직하다.
- [0310] 세포 배양 분석 및 동물 연구로부터 얻어진 데이터는 인간에서의 사용을 위한 범위의 투여량을 제제화하는 데 이용될 수 있다. 이러한 화합물의 투여량은 바람직하게는 독성이 거의 없거나 전혀 없는 ED₅₀을 포함하는 순환 농도의 범위 내에 놓여 있다. 투여량은 사용되는 투여 형태 및 활용되는 투여 경로에 따라 상기 범위 내에서 달라질 수 있다. 본 발명의 방법에서 사용되는 임의의 화합물 및/또는 조성물에 대해, 치료 유효량은 세포 배양 분석으로부터 최초로 평가될 수 있다. 이러한 용량은 동물 모델에서 제제화되어, 세포 배양에서 측정된 바와 같은 IC₅₀ (최대 억제-절반의 활성을 달성하는 시험 화합물의 농도)을 포함하는 순환 혈장 농도 범위를 달성할 수 있다. 이러한 정보를 이용하여 인간에서 유용한 용량을 보다 정확하게 측정할 수 있다. 혈장 중 수준은, 예를 들어 고성능 액상 크로마토그래피에 의해 측정될 수 있다.

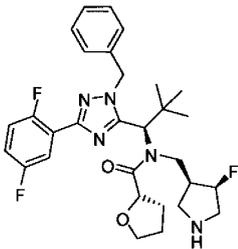
- [0311] 하기의 합성 및 생물학적 실시예는 본 발명을 설명하기 위해 제공되고, 어떠한 방식으로든 본 발명의 범주를 제한하는 것으로 해석되서는 안된다.
- [0312] **실시예**
- [0313] 하기의 실시예에 따라, 본 발명의 화합물은 본원에 기재된 방법 또는 당업계에 널리 공지되어 있는 기타 방법을 이용하여 합성되었다. 제조되지 않거나 분석되지 않은 화합물은 본원에 기재된 방법 또는 당업계에 공지되어 있는 기타 방법을 이용하여 제조되거나 또는 분석될 수 있다는 것을 이해한다.
- [0314] 화합물 및/또는 중간체는 2690 세퍼레이션 모듈(Separation Module) (메사추세츠주 밀포드 소재)을 갖는 워터스 밀레니엄(Waters Millennium) 크로마토그래피 시스템을 사용하는 고성능 액상 크로마토그래피 (HPLC)에 의해 특징화되었다. 분석용 컬럼은 알텍(Alltech) (일리노이드주 디어필드 소재)으로부터의 알티마(Alltima) C-18 역상, 4.6 x 250 mm였다. 전형적으로 5% 아세트니트릴/95% 물로 출발하여 40분의 기간에 걸쳐 100% 아세트니트릴로 진행되는 구배 용출을 사용하였다. 모든 용매는 0.1% 트리플루오로아세트산 (TFA)을 함유하였다. 화합물은 220 또는 254 nm의 자외선 (UV) 흡수에 의해 검출하였다. HPLC 용매는 부르딕 앤드 잭슨(Burdick and Jackson) (미시간주 무스케간 소재) 또는 피셔 사이언티픽(Fisher Scientific) (피츠버그주 피츠버그 소재)으로부터 구입하였다. 일부 예에서, 순도는 후면에 실리카겔이 있는 유리 또는 플라스틱 플레이트, 예를 들어 베이커-플렉스 실리카겔(Baker-Flex Silica Gel) 1B2-F 탄력적인 시트를 사용하는 박층 크로마토그래피 (TLC)로 평가하였다. TLC 결과는 자외선 하에, 또는 공지된 요오드 증기 및 기타 다양한 염색 기술을 이용함으로써 가시적으로 용이하게 검출되었다.
- [0315] 질량 분광 분석은 2개의 LC/MS 기기 중 하나 상에서 수행하였다: 워터스 시스템(Waters System) (알리안스 (Alliance) HT HPLC 및 마이크로매스(Micromass) ZQ 질량 분광계; 컬럼: 이클립스(Eclipse) XDB-C18, 2.1 x 50 mm; 용매계: 0.05% TFA를 함유한 물 중 5 → 95% (또는 35 → 95%, 또는 65 → 95% 또는 95 → 95%) 아세트니트릴; 유속 0.8 mL/분; 분자량 범위 500 내지 1500; 콘 전압(cone Voltage) 20 V; 컬럼 온도 40°C) 또는 휴렛 팩커드 시스템(Hewlett Packard System) (시리즈(Series) 1100 HPLC; 컬럼: 이클립스 XDB-C18, 2.1 x 50 mm; 용매계: 0.05% TFA를 함유한 물 중 1 → 95% 아세트니트릴; 유속 0.4 mL/분; 분자량 범위 150 내지 850; 콘 전압 50 V; 컬럼 온도 30°C). 모든 질량은 양자화된 모 이온의 질량으로서 보고되었다.
- [0316] GC/MS 분석은 휴렛 팩커드 기기 (질량 선택적 검출기 5973이 장착된 HP6890 시리즈 기체 크로마토그래피; 주사기 부피: 1 mL; 초기 컬럼 온도: 50°C; 최종 컬럼 온도: 250°C; 램프 시간: 20분; 기체 유속: 1 mL/분; 컬럼: 5% 페닐 메틸 실록산, 모델 번호 HP 190915-443, 치수: 30.0 m x 25 m x 0.25 m) 상에서 수행된다.
- [0317] 핵 자기 공명 (NMR) 분석은 바리안(Varian) 300 MHz NMR (캘리포니아주 팔로 알토 소재)을 이용하여 일부 화합물 상에서 수행하였다. 스펙트럼의 기준은 TMS 또는 용매의 공지된 화학 이동이었다. 일부 화합물 샘플을 승온 (예를 들어, 75°C)에서 진행하여 샘플 용해도 증가를 촉진하였다.
- [0318] 본 발명의 일부 화합물의 순도는 원소 분석 (아리조나주 투산 소재의 데저트 애널리틱스(Desert Analytics))으로 평가하였다.
- [0319] 용점은 래버러토리 디바이시스 멜-템프 장치(Laboratory Devices Mel-Temp apparatus) (메사추세츠주 홀리스톤 소재) 상에서 측정하였다.
- [0320] 분취용 분리는 플래쉬 40 크로마토그래피 시스템 및 KP-Sil, 60A (버지니아주 카를로테스빌 소재의 바이오티지 (Biotage))를 사용하여, 또는 실리카겔 (230-400 메시) 패키징 물질을 사용하는 플래쉬 컬럼 크로마토그래피에 의해, 또는 C-18 역상 컬럼을 사용하는 HPLC에 의해 수행하였다. 플래쉬 40 바이오티지 시스템 및 플래쉬 컬럼 크로마토그래피를 위해 사용되는 전형적인 용매는 디클로로메탄, 메탄올, EtOAc, 헥산, 아세톤, 수성 히드록시 아민 및 트리에틸 아민이었다. 역상 HPLC를 위해 사용되는 전형적인 용매는 가변적 농도의, 아세트니트릴 및 0.1% 트리플루오로아세트산을 함유한 물이었다.
- [0321] 달리 언급되지 않는 한, 모든 온도는 섭씨 온도이다. 또한, 이러한 실시예 및 다른 곳에서, 약어는 하기 의미를 갖는다:
- [0322] AcOH=아세트산
- [0323] aq.=수성
- [0324] ATP=아데노신 트리포스페이트

- [0325] Boc=tert-부틸옥시카르보닐
- [0326] BSA=소 혈청 알부민
- [0327] CAM=세틱 암모늄 폴리브레이트
- [0328] DCM=디클로로메탄
- [0329] DIAD=디이소프로필 아조디카르복실레이트
- [0330] DIBAL=디이소부틸알루미늄 수소화물
- [0331] DIEA=디이소프로필에틸아민
- [0332] DIPEA=디이소프로필에틸아민
- [0333] DMAP=디메틸아미노피리딘
- [0334] DMF=디메틸포름아미드
- [0335] DMSO=디메틸설폭사이드
- [0336] DTT=디티오프레이톨
- [0337] eq.=당량
- [0338] Et₂O=디에틸 에테르
- [0339] Et₃N=트리에틸 아민
- [0340] EtOAc=에틸 아세테이트
- [0341] EtOH=에탄올
- [0342] g=그램
- [0343] h=시간
- [0344] HPLC=고성능 액상 크로마토그래피
- [0345] L=리터
- [0346] LC/MS=액상 크로마토그래피/질량 분광학
- [0347] M=몰농도
- [0348] m=미터
- [0349] m/z=질량/전하 비율
- [0350] MeNH₂=메틸 아민
- [0351] mg=밀리그램
- [0352] min=분
- [0353] mL=밀리리터
- [0354] mm=밀리미터
- [0355] mM=밀리몰농도
- [0356] mmol=밀리몰
- [0357] mol=몰
- [0358] N=노말 농도
- [0359] nm=나노미터

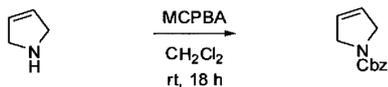
- [0360] nM=나노몰농도
- [0361] NMR=핵 자기 공명
- [0362] PPh₃=트리페닐 포스핀
- [0363] PhCF₃=트리플루오로메틸벤젠
- [0364] psi=제곱 인치 당 파운드
- [0365] RT=실온
- [0366] sat.=포화
- [0367] TEA=트리에틸아민
- [0368] THF=테트라히드로푸란
- [0369] TFA=트리플루오로아세트산
- [0370] TLC=박층 크로마토그래피
- [0371] TMS=트리메틸실릴
- [0372] TMSCl=트리메틸실릴 클로라이드
- [0373] μg=마이크로그램
- [0374] μl=마이크로리터
- [0375] μM=마이크로몰농도
- [0376] Up1c=초고성능 액체 크로마토그래피

[0377] **실시예 1**

[0378] (S)-N-((R)-1-(1-벤질-3-(2,5-디플루오로페닐)-1H-1,2,4-트리아졸-5-일)-2,2-디메틸프로필)-N-(((3R,4R)-4-플루오로피롤리딘-3-일)메틸)테트라히드로푸란-2-카르복사미드



- [0379]
- [0380] 절차
- [0381] 2,5-디히드로-1H-피롤의 Cbz 보호



- [0382]
- [0383] 디옥산 중 2,5-디히드로-1H-피롤 (30 g, 434 mmol, 96%; 알파 에이사(Alfa Aesar)로부터 입수)의 용액 (1000 ml, 0.43 M 용액)에 CbzOSu (130 g, 521 mmol)를 첨가하였다. 실온에서 18 h 동안 교반한 후, 반응 혼합물을 300 ml 부근으로 농축하고, EtOAc 1000 ml로 희석시켰다. 유기층을 물 및 염수로 세척하고, 무수 Na₂SO₄ 상에서 건조시키고, 여과하고, 진공하에 농축하였다. 플래쉬 컬럼 크로마토그래피에 의해, 목적하는 벤질 2,5-디히드로-1H-피롤-1-카르복실레이트를 무색 오일로서 91% 수율 (80.0 g)로 수득하였다. R_f = 0.6 (헥산 중 30% EtOAc).

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.32 (5H, m), 5.80

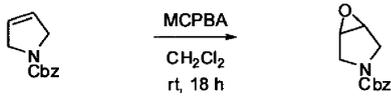
(2H, m), 5.77 (2H, s), 4.22 (4H, m). LC/MS (uplc): MH⁺ 204.2, 160.1 (-44), 0.86

분.

[0384]

벤질 2,5-디히드로-1H-피롤-1-카르복실레이트의 에폭시화

[0385]



[0386]

디클로로메탄 중 벤질 2,5-디히드로-1H-피롤-1-카르복실레이트 (33 g, 163 mmol, 90%; 알드리치(Aldrich)로부터 입수)의 용액 (540 ml, 0.3 M 용액)에 MCPBA (44 g, 340 mmol, 77%; 알드리치로부터 입수)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 18 h 동안 교반한 후, 포화 Na₂CO₃ 수용액 500 ml를 첨가하고, 생성된 혼합물을 실온에서 1 h 동안 교반하였다. 유기층을 분리하고, 물 및 염수로 세척하고, 무수 Na₂SO₄ 상에서 건조시키고, 여과하고, 진공하에 농축하였다. 플래쉬 컬럼 크로마토그래피에 의해, 목적하는 생성물을 황색 오일로서 83% 수율 (29.5 g)로 수득하였다.

[0387]

¹H NMR (CDCl₃,

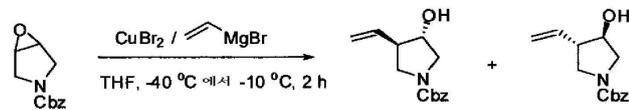
400 MHz): δ 3.38 (2H, m), 3.68 (2H, m), 3.87 (2H, m), 5.11 (2H, s), 7.33 (5H, m).

LC/MS (uplc): MH⁺ 220.0, 0.69 분.

[0388]

벤질 6-옥사-3-아자비시클로[3.1.0]hexan-3-카르복실레이트의 개환

[0389]



[0390]

무수 THF 중 벤질 6-옥사-3-아자비시클로[3.1.0]hexan-3-카르복실레이트 (28.5 g, 130 mmol) 및 CuBr·SMe₂ (26.7 g, 130 mmol)의 용액 (260 ml, 0.5 M 용액)에 비닐 마그네슘 브로마이드 (520 ml, THF 중 1.0 M 용액)를 -40°C에서 서서히 첨가하였다. 이어서, 반응 혼합물을 2 h 동안 -20°C까지 가온하였다. 포화 NH₄Cl 수용액 (200 ml)으로 킨칭한 후, 반응 혼합물을 EtOAc (500 ml)로 추출하였다. 유기층을 물 및 염수로 세척하고, 무수 Na₂SO₄ 상에서 건조시키고, 여과하고, 진공하에 농축하였다. 플래쉬 컬럼 크로마토그래피에 의해, 목적하는 트랜스-(±)-벤질 3-히드록시-4-비닐피롤리딘-1-카르복실레이트의 라세미 혼합물을 황색 액체로서 48% 수율 (15.5 g)로 수득하였다. R_f = 0.2 (hexan 중 30% EtOAc).

[0391]

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz):

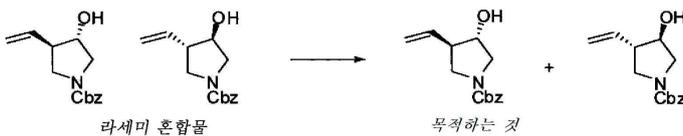
δ 2.71 (1H, m), 3.28 (2H, m), 3.72 (2H, m), 4.11 (1H, m), 5.14 (2H, s), 5.16-5.23 (2H,

m), 5.69 (1H, m), 7.33 (5H, m). LC/MS (uplc): MH⁺ 248.0, 0.78 분.

[0392]

트랜스-(±)-벤질 3-히드록시-4-비닐피롤리딘-1-카르복실레이트의 분할

[0393]

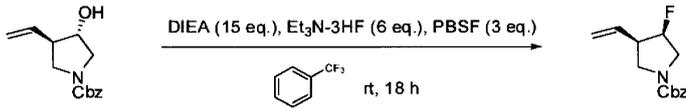


[0394]

키랄 HPLC (키랄팩(Chiralpak) AD-H 헵탄:EtOH:MeOH, 8:1:1)를 사용하여, 트랜스-(±)-벤질 3-히드록시-4-비닐피롤리딘-1-카르복실레이트의 라세미 혼합물 (14 g)을 분할하였다. 목적하는 거울상이성질체가 풍부한 (3S,4R)-벤질 3-히드록시-4-비닐피롤리딘-1-카르복실레이트 (6.7분; 6.3 g, >99.5% ee) 및 목적하지 않은 (3R,4S)-벤질 3-히드록시-4-비닐피롤리딘-1-카르복실레이트 (9.3분; 6.7 g, 99.5 % ee)를 92% 회수율로 수득하였다.

[0395]

[0396] (3S,4R)-벤질 3-히드록시-4-비닐피롤리딘-1-카르복실레이트의 플루오르화



[0397]

[0398] PhCF₃ 중 (3S,4R)-벤질 3-히드록시-4-비닐피롤리딘-1-카르복실레이트 (5.0 g, 20.2 mmol)의 용액 (81 ml, 0.25 M 용액)에 N,N-디이소프로필에틸아민 (53 ml, 303 mmol), 트리에틸아민 트리히드로플루오라이드 (19.8 ml, 121 mmol) 및 퍼플루오로-1-부탄술포닐 플루오라이드 (PBSF, 3.6 ml, 20.2 mmol)를 첨가하였다. 생성된 혼합물을 실온에서 교반하였다. 60 및 120분 후, 추가의 퍼플루오로-1-부탄술포닐 플루오라이드 (3.6 ml, 20.2 mmol)를 첨가하였다. 18시간 후, 반응 혼합물을 분별 깔때기로 옮기고, 1.0 N HCl 50 ml 로 2회 세척하고 (주의: 많은 양의 열이 생성됨), 포화 NaHCO₃ 수용액으로 2회 세척하고, H₂O 및 염수로 1회 세척하였다. 유기상을 무수 Na₂SO₄ 상에서 건조시키고, 여과하고, 농축하여 조 갈색 오일을 수득하였다. 플래쉬 컬럼 크로마토그래피 (SiO₂, 헥산 중 10% → 30% EtOAc)에 의해, 순수한 (3R,4R)-벤질 3-플루오로-4-비닐피롤리딘-1-카르복실레이트를 황색 오일로서 81% 수율 (4.1 g)로 수득하였다. R_f = 0.55 (헥산 중 30% EtOAc).

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz):

δ 7.37-7.25 (5H, m), 5.9 (1H, m), 5.24 (2H, m), 5.14 (2H, m), 5.03 (1H, dt, J = 52.8, 3.2 Hz), 3.9-3.5 (3H, m), 3.53 (1H, m), 2.83 (1H, m). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz):

δ 154.7, 154.6, 136.6, 131.89, 131.83, 128.48, 128.02, 127.94, 119.00, 118.94, 95.23, 94.47, 93.42, 92.67, 66.99, 66.94, 53.16, 52.94, 52.83, 52.60, 48.17, 48.02, 47.91,

47.83, 47.2, 47.1. LC/MS (uplc): MH⁺ 250.0, 0.93 분.

[0399]

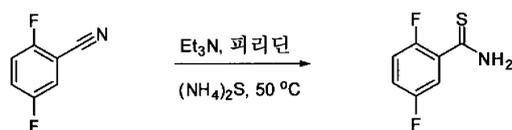
[0400] 비닐 플루오로피롤리딘의 산화성 절단



[0401]

[0402] CH₃OH 및 H₂O 중 (3R,4R)-벤질 3-플루오로-4-비닐피롤리딘-1-카르복실레이트 (1.78 g, 7.15 mmol)의 용액 (2:1, 30 ml, 0.2 M 용액)에 H₂O 중 OsO₄의 용액 (4% w/v 용액 3 ml, 0.5 mmol)을 첨가하였다. 이어서, NaIO₄ (4.6 g, 21.5 mmol)를 한번에 첨가하고, 생성된 혼합물을 실온에서 교반하였다. 2시간 후, 혼합물을 여과하여 침전된 백색 고체를 제거하고, 필터 케이크(cake)를 EtOAc로 세척하였다. 여과액을 진공하에 농축하여, 유기 용매의 대부분을 제거하였다. 잔류물을 EtOAc로 3회 추출하고, 합한 유기층을 무수 Na₂SO₄ 상에서 건조시키고, 여과하고, 농축하였다. 조 (3R,4S)-벤질 3-플루오로-4-포르밀피롤리딘-1-카르복실레이트를 추가 정제 없이 다음 단계에 사용하였다. LC/MS (uplc): MH⁺ 208.2 (-44), 252.0, 0.69 분.

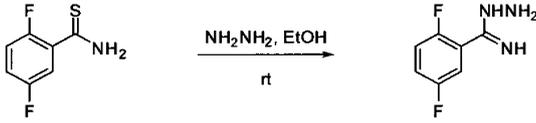
[0403] 2,5-디플루오로벤조티오아미드의 합성



[0404]

[0405] 피리딘 (90 ml) 중 2,5-디플루오로벤조니트릴 (25 g, 180 mmol)의 교반 용액을 물 중 20 wt% 암모늄 술폰아이드 (67.4 ml, 198 mmol) 및 트리에틸아민 (27.4 ml, 198 mmol)으로 처리하였다. 반응이 완료될 때까지 반응 혼합물을 50°C에서 5 hr 동안 교반하였다. 실온으로 냉각시킨 후, 혼합물을 냉수로 희석시키고, EtOAc로 추출하였다. 유기층을 분리한 다음, H₂O (x3), 염수 (x3)로 세척한 다음, 무수 Na₂SO₄ 상에서 건조하고, 여과하고, 감압하에 증발시켜, 조 생성물을 수득하였다. 실리카 겔 컬럼 (헥산 중 20% EtOAc) 상에서 정제하여, 2,5-디플루오로벤조티오아미드를 황색 고체 (31.0 g, 99%)로서 수득하였다. ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 7.12 (m, 2H), 7.90 (br, 2H), 8.08 (m, 1H). LC/MS (uplc): MH⁺ 174.0, 0.64분.

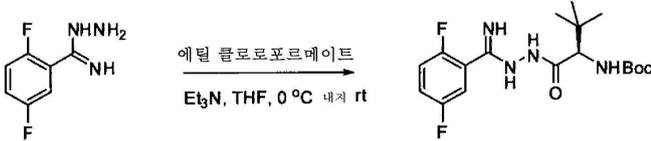
[0406] 2,5-디플루오로벤즈이미도히드라지드의 합성



[0407]

[0408] EtOH (150 ml) 중 2,5-디플루오로벤조티오아미드 (22.5 g, 129.7 mmol)의 교반 용액에 히드라진 (6.1 ml, 194.5 mmol)을 첨가하였다. 실온에서 30분 동안 교반한 후, 반응은 완료되었고 (LC/MS에 의함), 백색 고체가 침전되었다. 침전물을 여과하고, 헥산으로 세척하여, 2,5-디플루오로벤즈이미도히드라지드 (5.52 g, 94%)를 수득하였다.

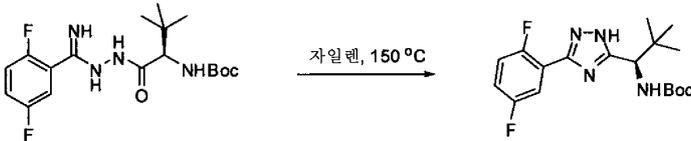
[0409] 2,5-디플루오로벤즈이미도히드라지드의 아실화



[0410]

[0411] N-Boc-D-tert-부틸글리신 (7.5 g, 32.4 mmol)을, 무수 THF (65 ml, 0.5 M) 중에서 에틸 클로로포르메이트 (3.41 ml, 35.6 mmol), Et₃N (6.8 ml, 48.6 mmol)를 -5°C 내지 0°C에서 첨가하여, 혼합된 무수물로 전환시켰다. 혼합물을 -5°C에서 30분 동안 교반하였다. 생성된 고체를 여과해 내고, 추가의 무수 THF를 첨가하여 침전물을 세척하였다. 이어서, 생성된 반응 용액을 -5°C에서 2,5-디플루오로벤즈이미도-히드라지드 (5.53 g, 32.4 mmol)의 THF 용액에 첨가하였다. 이어서, 반응물을 실온으로 점차적으로 가온하고, 밤새 교반하였다. 일단 반응이 완료되면, 혼합물을 EtOAc 및 H₂O 사이에 분배하였다. 유기층을 분리하고, H₂O, 염수로 세척한 다음, 무수 Na₂SO₄ 상에서 건조하고, 여과하고, 감압하에 증발시켜, 조 생성물을 수득하였고, 이를 실리카 겔 컬럼 (헥산 중 50% EtOAc) 상에서 정제하여 (R)-tert-부틸 1-(2-((2,5-디플루오로페닐)(이미노)메틸)히드라지닐)-3,3-디메틸-1-옥소부탄-2-일카르바메이트 (67%)를 수득하였다. R_f = 0.4 (헥산 중 50% EtOAc). LC/MS (uplc): MH⁺ 385.3, 0.65분.

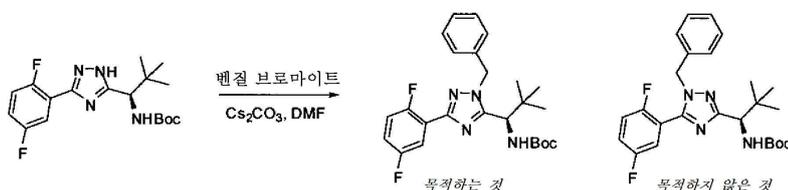
[0412] (R)-tert-부틸 1-(3-(2,5-디플루오로페닐)-1H-1,2,4-트리아졸-5-일)-2,2-디메틸프로필카르바메이트의 합성



[0413]

[0414] (R)-tert-부틸 1-(2-((2,5-디플루오로페닐)(이미노)메틸)히드라지닐)-3,3-디메틸-1-옥소부탄-2-일카르바메이트 (8.35 g, 21.7 mmol)를 자일렌 (200 ml) 중에 용해시켰다. 딤-스타크(Dean-Stark) 트랩을 구비하고, 반응 혼합물을 150°C로 가열하였다. 일단 반응이 완료되면, 혼합물을 실온으로 냉각되도록 한 다음, EtOAc 및 포화 NaHCO₃ 수용액 사이에 분배하였다. 유기층을 분리한 다음, 포화 NaHCO₃ 수용액, H₂O 및 염수로 세척하고, 이어서 Na₂SO₄ 상에서 건조시키고, 여과하고, 감압하에 증발시켜, (R)-tert-부틸 1-(3-(2,5-디플루오로페닐)-1H-1,2,4-트리아졸-5-일)-2,2-디메틸프로필카르바메이트 (7.81 g, 98%)를 수득하고 이를 추가 정제 없이 다음 단계에 사용하였다. LC/MS (uplc): MH⁺ 367.2, 0.98분.

[0415] 벤질 브로마이드를 사용한, (R)-tert-부틸 1-(3-(2,5-디플루오로페닐)-1H-1,2,4-트리아졸-5-일)-2,2-디메틸프로필카르바메이트의 알킬화



[0416]

[0417] DMF 중 (R)-tert-부틸 1-(3-(2,5-디플루오로페닐)-1H-1,2,4-트리아졸-5-일)-2,2-디메틸프로필카르바메이트 (5.89 g, 16.1 mmol) 및 Cs₂CO₃ (10.5 g, 32.2 mmol)의 교반 현탁액 (46 ml, 0.35 M)에 벤질 브로마이드 (2.11 ml, 17.7 mmol)를 첨가하였다. 일단 유기층을 분리하고, H₂O, 염수로 세척한 다음, Na₂SO₄ 상에서 건조시키고, 여과하고, 진공하에 증발시켜, (R)-tert-부틸 1-(1-벤질-3-(2,5-디플루오로페닐)-1H-1,2,4-트리아졸-5-일)-2,2-디메틸프로필카르바메이트를 수득하였다. 목적하는 위치이성질체를 실리카 겔 컬럼 (헥산 중 0% → 100% EtOAc, 3.25 g, 44.3%) 상에서 수득하였다. 구조식은 ¹H NMR nOe 실험에 의해 규명하였다.

[0418] 목적하는 거울상이성질체인 경우, ((R)-tert-부틸 1-(1-벤질-3-(2,5-디플루오로페닐)-1H-1,2,4-트리아졸-5-일)-2,2-디메틸프로필카르바메이트): 결정,

LC/MS (uplc): MH⁺ 457.2, 1.36 분. ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 7.78 (m, 1H), 7.29-7.39 (m, 5H), 7.00-7.18 (m, 2H), 5.53 (s, 2H), 5.20 (d, 2H), 4.83 (m, 2H), 1.41 (s, 9H), 0.91 (s, 9H).

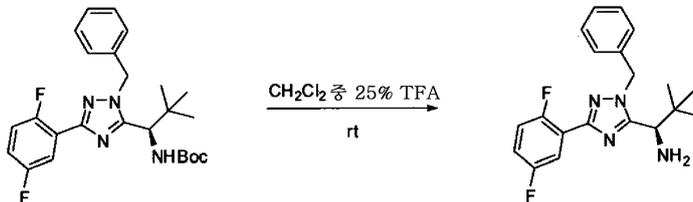
[0419]

[0420] 목적하지 않은 거울상이성질체인 경우, ((R)-tert-부틸 1-(1-벤질-5-(2,5-디플루오로페닐)-1H-1,2,4-트리아졸-3-일)-2,2-디메틸프로필카르바메이트): 무색 오일,

LC/MS (uplc): MH⁺ 457.2, 1.25 분. ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 7.25 (m, 5H), 7.15 (m, 2H), 7.05 (m, 1H), 5.45 (d, 2H), 5.28 (s, 2H), 4.85 (d, 2H), 1.43 (s, 9H), 0.97 (s, 9H).

[0421]

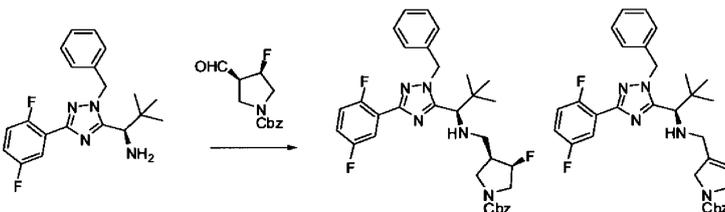
[0422] (R)-tert-부틸 1-(1-벤질-3-(2,5-디플루오로페닐)-1H-1,2,4-트리아졸-5-일)-2,2-디메틸프로필카르바메이트의 보호



[0423]

[0424] (R)-tert-부틸 1-(1-벤질-3-(2,5-디플루오로페닐)-1H-1,2,4-트리아졸-5-일)-2,2-디메틸프로필카르바메이트 (3.25 g, 7.13 mmol)를 CH₂Cl₂ (30 ml) 중 TFA (10 ml)로 처리하였다. 일단 반응이 완료되면, 반응물을 진공하에 농축한 다음, EtOAc 및 포화 NaHCO₃ 수용액 사이에 분배하였다. 유기물을 분리한 다음, H₂O, 염수로 세척하는 것에 이어서, Na₂SO₄ 상에서 건조시키고, 여과하고, 감압하에 증발시켜, (R)-1-(1-벤질-3-(2,5-디플루오로페닐)-1H-1,2,4-트리아졸-5-일)-2,2-디메틸프로판-1-아민 (2.32 g, 91%)을 수득하고, 이를 추가 정제 없이 다음 단계에 바로 사용하였다. LC/MS (uplc): MH⁺ 357.1, 0.82분.

[0425] 환원성 알킬화

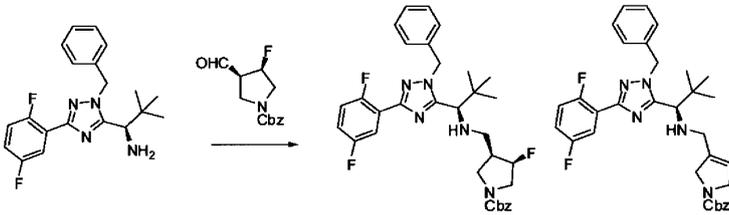


[0426]

[0427] CH₂Cl₂ (59 ml) 중 (R)-1-(1-벤질-3-(2,5-디플루오로페닐)-1H-1,2,4-트리아졸-5-일)-2,2-디메틸프로판-1-아민 (2.55 g, 7.15 mmol)의 용액에 CH₂Cl₂ (10 ml) 중 조 (3R,4S)-벤질 3-플루오로-4-포르밀피롤리딘-1-카르복실레이트 (1.4 당량의 (3R,4R)-벤질 3-플루오로-4-비닐피롤리딘-1-카르복실레이트로부터 수득함) 및 NaBH(OAc)₃ (2.3 g, 10.7 mmol)를 첨가하였다. 이어서, 반응 혼합물을 실온에서 16 h 동안 교반하였다. 포화 NaHCO₃ 수용액으로 켄칭한 후, 반응 혼합물을 EtOAc로 추출하였다. 유기층을 물 및 염수로 세척하고, 무수 Na₂SO₄ 상에서

건조시키고, 여과하고, 농축하였다. 환원성 아미노화 조 생성물은 HF 제거된 알켄 생성물 (실리카 컬럼 크로마토그래피 또는 분취용 역상 HPLC 상에서 분리 불가능함)로 오염되어 있다. 따라서, 조 혼합물 (3.0 g)을 아세톤 및 물 (5:1, 120 ml) 중에 용해시켰다. 4-메틸모르폴린 N-옥시드 (715 mg, 6.1 mmol) 및 OsO₄ (4% w/v 용액 2.15 ml)를 이 반응 혼합물에 첨가한 다음, 실온에서 주말에 걸쳐 교반하였다. 진공하에 아세톤을 제거한 후, 남아있는 수성층을 EtOAc로 추출하였다. 유기층을 물 및 염수로 세척하고, 무수 Na₂SO₄ 상에서 건조시키고, 여과하고, 농축하였다. 목적하는 (3R,4R)-벤질 3-(((R)-1-(1-벤질-3-(2,5-디플루오로페닐)-1H-1,2,4-트리아졸-5-일)-2,2-디메틸프로필아미노)메틸)-4-플루오로피롤리딘-1-카르복실레이트를 실리카 컬럼 크로마토그래피 상에서 수득하였다 (헥산 중 35% → 80% EtOAc, 1.5 g, 35%). LC/MS (uplc) MH⁺ 592.3, 0.97분.

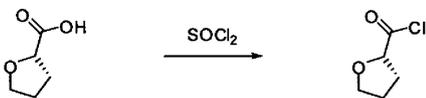
[0428] 환원성 알킬화



[0429]

CH₂Cl₂ (59 ml) 중 (R)-1-(1-벤질-3-(2,5-디플루오로페닐)-1H-1,2,4-트리아졸-5-일)-2,2-디메틸프로판-1-아민 (2.55 g, 7.15 mmol)의 용액에 CH₂Cl₂ (10 ml) 중 조 (3R,4S)-벤질 3-플루오로-4-포르밀피롤리딘-1-카르복실레이트 (1.4 당량의 (3R,4R)-벤질 3-플루오로-4-비닐피롤리딘-1-카르복실레이트로부터 수득함) 및 NaBH(OAc)₃ (2.3 g, 10.7 mmol)를 첨가하였다. 이어서, 반응 혼합물을 실온에서 16 h 동안 교반하였다. 포화 NaHCO₃ 수용액으로 켄칭한 후, 반응 혼합물을 EtOAc로 추출하였다. 유기층을 물 및 염수로 세척하고, 무수 Na₂SO₄ 상에서 건조시키고, 여과하고, 농축하였다. 환원성 아미노화 조 생성물은 HF 제거된 알켄 생성물 (실리카 컬럼 크로마토그래피 또는 분취용 역상 HPLC 상에서 분리 불가능함)로 오염되어 있다. 따라서, 조 혼합물 (3.0 g)을 아세톤 및 물 (5:1, 120 ml) 중에 용해시켰다. 4-메틸모르폴린 N-옥시드 (715 mg, 6.1 mmol) 및 OsO₄ (4% w/v 용액 2.15 ml)를 이 반응 혼합물에 첨가한 다음, 실온에서 주말에 걸쳐 교반하였다. 진공하에 아세톤을 제거한 후, 남아있는 수성층을 EtOAc로 추출하였다. 유기층을 물 및 염수로 세척하고, 무수 Na₂SO₄ 상에서 건조시키고, 여과하고, 농축하였다. 목적하는 (3R,4R)-벤질 3-(((R)-1-(1-벤질-3-(2,5-디플루오로페닐)-1H-1,2,4-트리아졸-5-일)-2,2-디메틸프로필아미노)메틸)-4-플루오로피롤리딘-1-카르복실레이트를 실리카 컬럼 크로마토그래피 상에서 수득하였다 (헥산 중 35% → 80% EtOAc, 1.5 g, 35%). LC/MS (uplc) MH⁺ 592.3, 0.97분.

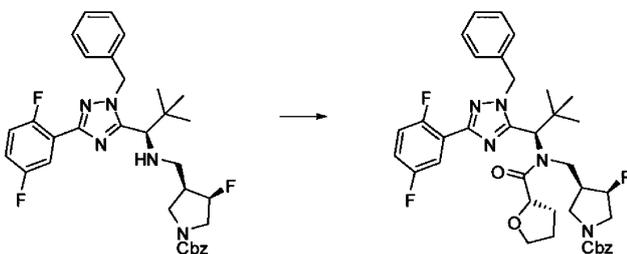
[0431] 산 염화물의 제조



[0432]

(S)-테트라히드로푸란-2-카르복실산 (5.1 g, 44 mmol)을 SOCl₂ (15 ml)와 함께 용해시켰다. 반응 혼합물을 30 분 동안 환류시켰다. 휘발성 물질을 진공하에 제거한 후, 조 (S)-테트라히드로푸란-2-카르보닐 클로라이드 (6.0 g, >99%)를 다음 단계를 위해 사용하였다.

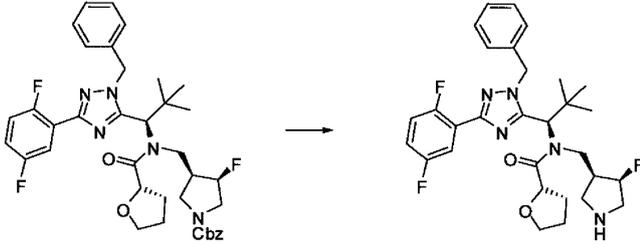
[0434] 아미드 결합 형성



[0435]

[0436] 디클로로메탄 중 (3R,4R)-벤질 3-(((R)-1-(1-벤질-3-(2,5-디플루오로페닐)-1H-1,2,4-트리아졸-5-일)-2,2-디메틸프로필아미도)메틸)-4-플루오로피롤리딘-1-카르복실레이트 (500 mg, 0.845 mmol)의 용액 (8.5 ml, 0.1 M 용액)에 트리에틸아민 (236 μ l, 1.69 mmol)을 실온에서 첨가하였다. 이어서, 조 (S)-테트라히드로푸란-2-카르보닐 클로라이드 (227 mg, 1.69 mmol)를 2분에 걸쳐 적가하였다. 생성된 용액을 실온에서 밤새 교반하였다. 반응 혼합물을 H₂O로 켄칭하고, EtOAc로 추출하였다. 유기층을 무수 나트륨 술페이트 상에서 건조시키고, 여과하였다. 휘발성 유기 물질을 진공하에 제거한 후, 목적하는 (3R,4R)-벤질 3-(((S)-N-((R)-1-(1-벤질-3-(2,5-디플루오로페닐)-1H-1,2,4-트리아졸-5-일)-2,2-디메틸프로필)테트라히드로푸란-2-카르복스아미도)메틸)-4-플루오로피롤리딘-1-카르복실레이트를 플래쉬 컬럼 크로마토그래피 (헥산 중 0% → 100% EtOAc) 상에서 정제하였다 (수율: N/A). LC/MS (uplc): MH⁺ 690.5, 1.35분.

[0437] 탈보호



[0438]

[0439] 탈기된 EtOAc 중 (3R,4R)-벤질 3-(((S)-N-((R)-1-(1-벤질-3-(2,5-디플루오로페닐)-1H-1,2,4-트리아졸-5-일)-2,2-디메틸프로필)테트라히드로푸란-2-카르복스아미도)메틸)-4-플루오로피롤리딘-1-카르복실레이트 (583 mg, 0.845 mmol)의 용액 (8 ml, 0.1 M 용액)에 Pd/C (899 mg, 10 wt%)를 무수 N₂ 분위기 하에 첨가하였다. 수소 기체로 플라싱(flushing)한 후, 수소 기체 벌룬(balloon)을 구비한 반응 혼합물을 실온에서 밤새 교반하였다. 반응 혼합물을 셀라이트(Celite)[®] 패드를 통해 여과하고, EtOAc로 세척하였다. 휘발성 유기 여과물을 진공하에 제거하여, 조 생성물을 수득하고, 이를 분취용 역상 HPLC로 정제하였다. 생성물의 합한 분획물을 포화 NaHCO₃ 용액으로 중화시킨 다음, EtOAc로 추출하였다. 유기층을 무수 나트륨 술페이트 상에서 건조시키고, 여과하고, 진공하에 농축하였다. 이어서, 건조된 생성물을 아세트니트릴 및 물 (1:1 비율) 중에 용해시키고, 48 h 동안 동결건조시켰다. 백색 분말성 (S)-N-((R)-1-(1-벤질-3-(2,5-디플루오로페닐)-1H-1,2,4-트리아졸-5-일)-2,2-디메틸프로필)-N-(((3S,4R)-4-플루오로피롤리딘-3-일)메틸)테트라히드로푸란-2-카르복스아미드를 유리 아민으로서 27.9% 수율 (131 mg)로 수득하였다:

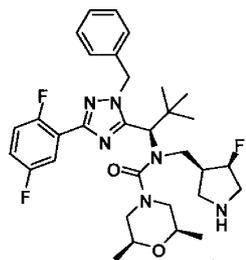
¹H NMR (CD₃Cl, 400 MHz): δ 7.82 (1H, m), 7.53

(2H, m), 7.35-7.27 (3H, m), 7.14 (1H, m), 7.06 (1H, m), 6.14 (1H, s), 5.45 (2H, m), 4.85 (2H, m), 4.72 (1H, m), 4.21 (1H, m), 3.97 (1H, m), 3.83 (1H, m), 3.02 (1H, m), 2.80 (1H, m), 2.33-1.80 (6H, m), 1.25 (1H, s), 1.01 (1H, m), 0.99 (9H, s). LC/MS (uplc): MH⁺ 556.4, 0.99 분.

[0440]

[0441] 실시예 2

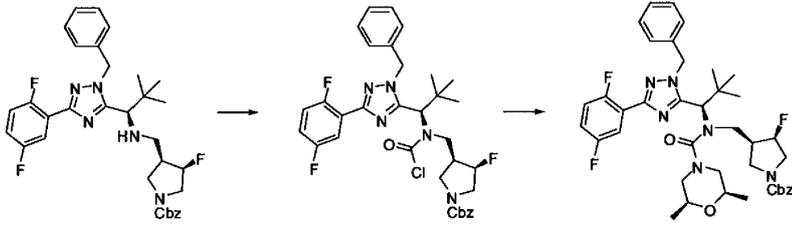
[0442] N-((R)-1-(1-벤질-3-(2,5-디플루오로페닐)-1H-1,2,4-트리아졸-5-일)-2,2-디메틸프로필)-N-(((3R,4R)-4-플루오로피롤리딘-3-일)메틸)-2,6-디메틸모르폴린-4-카르복스아미드



[0443]

[0444] 절차

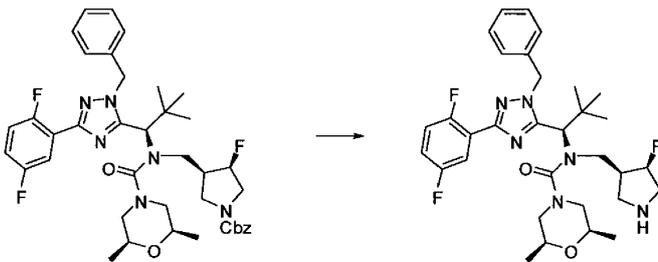
[0445] 우레아 형성



[0446]

[0447] 디클로로메탄 중 (3R,4R)-벤질 3-(((R)-1-(3-(2,5-디플루오로페닐)-1-(3-플루오로벤질)-1H-1,2,4-트리아졸-5-일)-2,2-디메틸프로필아미노)메틸)-4-플루오로피롤리딘-1-카르복실레이트 (110 mg, 0.186 mmol)의 용액 (1.9 ml, 0.1 M 용액)에 실온에서 트리에틸아민 (78 μ l, 0.558 mmol)을 첨가한 다음, 톨루엔 중 20% 포스젠 (66 mg, 0.223 mmol)을 첨가하였다. 생성된 용액을 실온에서 15분 동안 교반한 후 LC/MS (uplc): (3S,4R)-벤질 3-(((R)-1-(1-벤질-3-(2,5-디플루오로페닐)-1H-1,2,4-트리아졸-5-일)-2,2-디메틸프로필)아미노)메틸)-4-플루오로피롤리딘-1-카르복실레이트에 대해서 MH⁺ 654.3, 1.37분), 2,6-디메틸모르폴린 (64 mg, 0.558 mmol)을 첨가하고, 40°C에서 밤새 (밀봉 튜브에서) 가열하였다. 반응 혼합물을 H₂O로 켄칭하고, EtOAc로 추출하였다. 유기층을 NaHCO₃ 용액 및 염수로 세척하고, 무수 나트륨 술페이트 상에서 건조시키고, 여과하고, 농축하였다. 휘발성 유기 물질을 진공하에 제거한 후, 조 생성물을 분취용 역상 HPLC 상에서 정제하였다. 생성물의 합한 분획물을 포화 NaHCO₃ 용액으로 중화시킨 다음, EtOAc로 추출하였다. 유기층을 무수 나트륨 술페이트 상에서 건조시키고, 여과하고, 진공하에 농축하여, 목적하는 (3R,4R)-벤질 3-(((2S,6R)-N-((R)-1-(1-벤질-3-(2,5-디플루오로페닐)-1H-1,2,4-트리아졸-5-일)-2,2-디메틸프로필)-2,6-디메틸모르폴린-4-카르복스아미도)메틸)-4-플루오로피롤리딘-1-카르복실레이트 (91 mg, 66.7%, 2 단계에 걸침)를 수득하였다. LC/MS (uplc): MH⁺ 733.5, 1.41분.

[0448] 탈보호



[0449]

[0450] 탈기된 에탄올 중 (3R,4R)-벤질 3-(((2S,6R)-N-((R)-1-(1-벤질-3-(2,5-디플루오로페닐)-1H-1,2,4-트리아졸-5-일)-2,2-디메틸프로필)-2,6-디메틸모르폴린-4-카르복스아미도)메틸)-4-플루오로피롤리딘-1-카르복실레이트 (91 mg, 0.124 mmol)의 용액 (12 ml, 0.1 M 용액)에 Pd/C (2.64 mg, 10 wt%)를 무수 N₂ 분위기하에 첨가하였다. 수소 기체로 플라싱한 후, 수소 기체 별분을 구비한 반응 혼합물을 실온에서 45분 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 셀라이트[®] 패드를 통해 여과하고, EtOAc로 세척하였다. 휘발성 유기 여과물을 진공하에 제거하여 조 생성물을 수득하고, 이를 분취용 역상 HPLC로 정제하였다. 생성물의 합한 분획물을 포화 NaHCO₃ 용액으로 중화시킨 다음, EtOAc로 추출하였다. 유기층을 무수 나트륨 술페이트 상에서 건조시키고, 여과하고, 진공하에 농축하였다. 이어서, 건조된 생성물을 아세트니트릴 및 물 (1:1 비율) 중에 용해시키고, 48 h 동안 동결건조시켰다. 백색 분말성 (2S,6R)-N-((R)-1-(1-벤질-3-(2,5-디플루오로페닐)-1H-1,2,4-트리아졸-5-일)-2,2-디메틸프로필)-N-(((3S,4R)-4-플루오로피롤리딘-3-일)메틸)-2,6-디메틸모르폴린-4-카르복스아미드를 유리 아민으로서 94% 수율 (70 mg)로 수득하였다.

$^1\text{H NMR}$ (CD_3Cl , 300 MHz): δ 7.83 (1H, m),

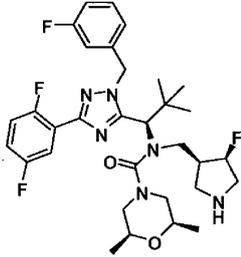
7.52 (2H, m), 7.34-7.27 (3H, m), 7.08 (1H, m), 7.04 (1H, m), 5.94 (2H, m), 5.41 (1H, s), 3.92-3.62 (3H, m), 3.60-3.45 (3H, m), 3.17-2.58 (3H, m), 2.57-2.37 (1H, m), 2.35-2.04 (2H, m), 1.85 (2H, m), 1.20 (6H, s), 0.9 (1H, m), 0.8 (9H, s). LC/MS (uplc):

MH^+ 599.5, 1.06 분.

[0451]

[0452] 실시예 3

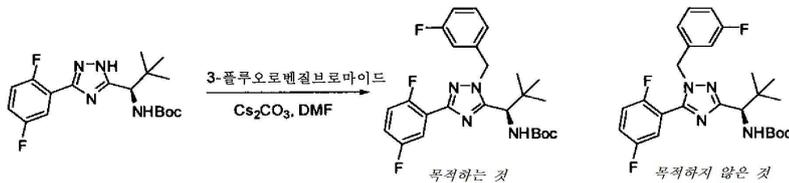
[0453] N-((R)-1-(3-(2,5-디플루오로페닐)-1-(3-플루오로벤질)-1H-1,2,4-트리아졸-5-일)-2,2-디메틸프로필)-N-(((3R,4R)-4-플루오로피롤리딘-3-일)메틸)-2,6-디메틸모르폴린-4-카르복사미드



[0454]

[0455] 절차

[0456] 3-플루오로벤질 브로마이드를 사용한, (R)-tert-부틸 1-(3-(2,5-디플루오로페닐)-1H-1,2,4-트리아졸-5-일)-2,2-디메틸프로필카르바메이트의 알킬화 (CHIR782903의 경우)

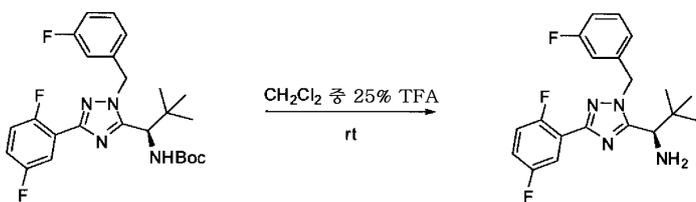


[0457]

[0458] DMF 중 (R)-tert-부틸 1-(3-(2,5-디플루오로페닐)-1H-1,2,4-트리아졸-5-일)-2,2-디메틸프로필카르바메이트 (5.89 g, 16.1 mmol) 및 Cs_2CO_3 (10.5 g, 32.2 mmol)의 교반 현탁액 (46 ml, 0.35 M)에 3-플루오로벤질 브로마이드 (2.17 ml, 17.7 mmol)를 첨가하였다. 일단 반응이 완료되면, 혼합물을 EtOAc 및 H_2O 사이에 분배하였다. 유기층을 분리하고, H_2O , 염수로 세척한 다음, Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 여과하고, 진공하에 증발시켜, (R)-tert-부틸 1-(3-(2,5-디플루오로페닐)-1-(3-플루오로벤질)-1H-1,2,4-트리아졸-5-일)-2,2-디메틸프로필카르바메이트를 수득하였다. 보다 덜 극성인 목적하는 위치이성질체를 실리카 겔 컬럼에 의해 수득하였다 (헥산 중 0% → 100% EtOAc, 5.05 g, 66.2%).

[0459] 목적하는 거울상이성질체인 경우, (R)-tert-부틸 1-(3-(2,5-디플루오로페닐)-1-(3-플루오로벤질)-1H-1,2,4-트리아졸-5-일)-2,2-디메틸프로필카르바메이트: LC/MS (uplc) 475.2, 1.35분. 목적하지 않은 거울상이성질체인 경우, (R)-tert-부틸 1-(5-(2,5-디플루오로페닐)-1-(3-플루오로벤질)-1H-1,2,4-트리아졸-3-일)-2,2-디메틸프로필카르바메이트: LC/MS (uplc) MH^+ 475.2, 1.24분.

[0460] (R)-tert-부틸 1-(1-벤질-3-(2,5-디플루오로페닐)-1H-1,2,4-트리아졸-5-일)-2,2-디메틸프로필카르바메이트의 탈보호 (CHIR782903의 경우)

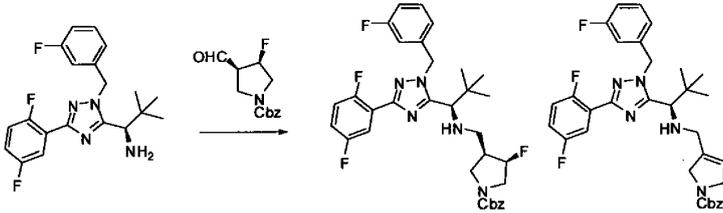


[0461]

[0462] (R)-tert-부틸 1-(3-(2,5-디플루오로페닐)-1-(3-플루오로벤질)-1H-1,2,4-트리아졸-5-일)-2,2-디메틸프로필카르

바메이트 (5.05 g, 10.7 mmol)를 CH₂Cl₂ (30 ml) 중 TFA (10 ml)로 처리하였다. 일단 반응이 완료되면, 반응물을 진공하에 농축한 다음, EtOAc 및 포화 NaHCO₃ 수용액 사이에 분배하였다. 유기물을 분리한 다음, H₂O, 염수로 세척하는 것에 이어서, Na₂SO₄ 상에서 건조시키고, 여과하고, 감압하에 증발시켜, (R)-1-(3-(2,5-디플루오로페닐)-1-(3-플루오로벤질)-1H-1,2,4-트리아졸-5-일)-2,2-디메틸프로판-1-아민을 수득하였고 (2.55 g, 64%), 이를 추가 정제 없이 다음 단계에 바로 사용하였다. LC/MS (uplc) MH⁺ 375.1, 0.83분.

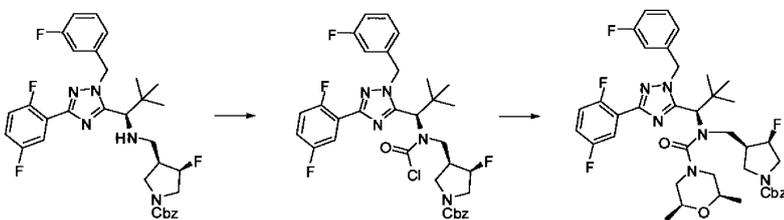
[0463] 환원성 알킬화



[0464]

CH₂Cl₂ (58 ml) 중 (R)-1-(3-(2,5-디플루오로페닐)-1-(3-플루오로벤질)-1H-1,2,4-트리아졸-5-일)-2,2-디메틸프로판-1-아민 (2.55 g, 6.8 mmol)의 용액에, CH₂Cl₂ (10 ml) 중 조 (3R,4S)-벤질 3-플루오로-4-포르밀피롤리딘-1-카르복실레이트 (1.4 당량의 (3R,4R)-벤질 3-플루오로-4-비닐피롤리딘-1-카르복실레이트로부터 수득함) 및 NaBH(OAc)₃ (2.2 g, 10.2 mmol)를 첨가하였다. 이어서, 반응 혼합물을 실온에서 16 h 동안 교반하였다. 포화 NaHCO₃ 수용액으로 켄칭한 후, 반응 혼합물을 EtOAc로 추출하였다. 유기층을 물 및 염수로 세척하고, 무수 Na₂SO₄ 상에서 건조시키고, 여과하고, 농축하였다. 환원성 아미노화 조 생성물은 HF 제거된 알켄 생성물 (실리카 컬럼 크로마토그래피 또는 분취용 역상 HPLC에 의해서 분리 불가능함)로 오염되어 있다. 따라서, 조 혼합물 (2.89 g)을 아세톤 및 물 (5:1, 120 ml) 중에 용해시켰다. 4-메틸모르폴린 N-옥시드 (667 mg, 5.7 mmol) 및 OsO₄ (4% w/v 용액 1.51 ml)를 이 반응 혼합물에 첨가한 다음, 실온에서 주말에 걸쳐 교반하였다. 아세톤을 진공하에 제거한 후, 남아있는 수성층을 EtOAc로 추출하였다. 유기층을 물 및 염수로 세척하고, 무수 Na₂SO₄ 상에서 건조시키고, 여과하고, 농축하였다. 목적하는 (3R,4R)-벤질 3-(((R)-1-(3-(2,5-디플루오로페닐)-1-(3-플루오로벤질)-1H-1,2,4-트리아졸-5-일)-2,2-디메틸프로필아미노)메틸)-4-플루오로피롤리딘-1-카르복실레이트를 실리카 컬럼 크로마토그래피 상에서 수득하였다 (hexan 중 40% → 90% EtOAc, 2.16 g, 52%). LC/MS (uplc): MH⁺ 610.2, 0.99분.

[0466] 우레아 형성

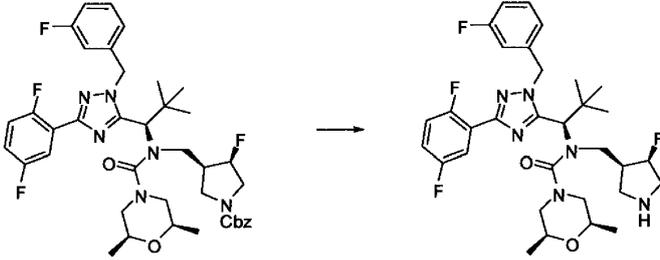


[0467]

디클로로메탄 중 (3R,4R)-벤질 3-(((R)-1-(3-(2,5-디플루오로페닐)-1-(3-플루오로벤질)-1H-1,2,4-트리아졸-5-일)-2,2-디메틸프로필아미노)메틸)-4-플루오로피롤리딘-1-카르복실레이트 (30 mg, 0.049 mmol)의 용액 (450 μl, 0.1 M 용액)에 트리에틸아민 (20.6 μl, 0.148 mmol)을 실온에서 첨가하는 것에 이어서, 톨루엔 중 20% 포스겐 (6.2 μl, 0.059 mmol)을 첨가하였다. 생성된 용액을 실온에서 15분 동안 교반한 후 (LC/MS (uplc): (3S,4R)-벤질 3-(((R)-1-(1-벤질-3-(2,5-디플루오로페닐)-1H-1,2,4-트리아졸-5-일)-2,2-디메틸프로필(클로로카르보닐)아미노)메틸)-4-플루오로피롤리딘-1-카르복실레이트에 대해 MH⁺ 654.3, 1.37분), 2,6-디메틸모르폴린 (64 mg, 0.558 mmol)을 첨가하고, 실온에서 15분 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 H₂O로 켄칭하고, EtOAc로 추출하였다. 유기층을 NaHCO₃ 용액 및 염수로 세척하고, 무수 나트륨 술페이트 상에서 건조시키고, 여과하고, 농축하였다. 휘발성 유기 물질을 진공하에 제거한 후, 조 생성물을 분취용 역상 HPLC 상에서 정제하였다. 생

성물의 합한 분획물을 포화 NaHCO₃ 용액으로 중화시킨 다음, EtOAc로 추출하였다. 유기층을 무수 나트륨 술페이트 상에서 건조시키고, 여과하고, 진공하에 농축하여, 목적하는 (3R,4R)-벤질 3-(((2S,6R)-N-((R)-1-(3-(2,5-디플루오로페닐)-1-(3-플루오로벤질)-1H-1,2,4-트리아졸-5-일)-2,2-디메틸프로필)-2,6-디메틸모르폴린-4-카르복스아미도)메틸)-4-플루오로피롤리딘-1-카르복실레이트 (30 mg, 81%, 2 단계에 걸침)를 수득하였다. LC/MS (uplc): MH⁺ 751.5, 1.39분.

[0469] 탈보호



[0470]

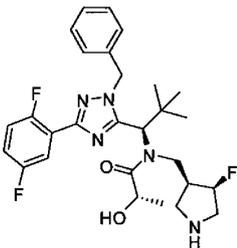
[0471] 탈기된 에탄올 중 (3R,4R)-벤질 3-(((2S,6R)-N-((R)-1-(3-(2,5-디플루오로페닐)-1-(3-플루오로벤질)-1H-1,2,4-트리아졸-5-일)-2,2-디메틸프로필)-2,6-디메틸모르폴린-4-카르복스아미도)메틸)-4-플루오로피롤리딘-1-카르복실레이트 (35 mg, 0.047 mmol)의 용액 (10 ml, 4.7 mM 용액)에 Pd/C (0.99 mg, 10 wt%)를 무수 N₂ 분위기하에 첨가하였다. 수소 기체로 플러싱한 후, 수소 기체 별론을 구비한 반응 혼합물을 실온에서 밤새 교반하였다. 반응 혼합물을 셀라이트® 패드를 통해 여과하고, EtOAc로 세척하였다. 휘발성 유기 여과물을 진공하에 제거하여, 조 생성물을 수득하고, 이를 분취용 역상 HPLC로 정제하였다. 생성물의 합한 분획물을 포화 NaHCO₃ 용액으로 중화시킨 다음, EtOAc로 추출하였다. 유기층을 무수 나트륨 술페이트 상에서 건조시키고, 여과하고, 진공하에 농축하였다. 이어서, 건조된 생성물을 아세트니트릴 및 물 (1:1 비율) 중에 용해시키고, 48 h 동안 동결건조시켰다. 백색 분말성 (2S,6R)-N-((R)-1-(3-(2,5-디플루오로페닐)-1-(3-플루오로벤질)-1H-1,2,4-트리아졸-5-일)-2,2-디메틸프로필)-N-(((3S,4R)-4-플루오로피롤리딘-3-일)메틸)-2,6-디메틸모르폴린-4-카르복스아미드를 유리 아민으로서 63% 수율 (18 mg)로 수득하였다.

¹H NMR (CD₃Cl, 300 MHz): δ 7.84 (1H, m), 7.32-6.95 (6H, m), 5.79 (2H, m), 5.36 (1H, s), 4.58 (1H, m), 3.91-3.72 (3H, m), 3.65-3.50 (3H, m), 3.04 (1H, m), 2.97-2.65 (2H, m), 2.53 (1H, m), 2.36 (1H, m), 2.18 (1H, m), 1.20 (6H, s), 0.9 (1H, m), 0.84 (9H, s). LC/MS (uplc): MH⁺ 617.5, 1.06 분.

[0472]

[0473] 실시예 4

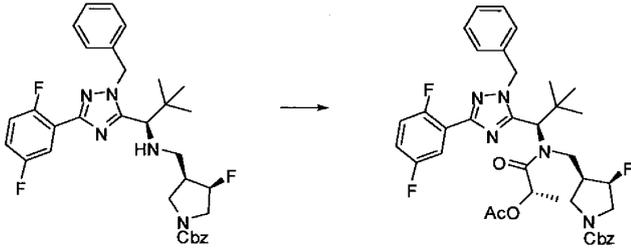
[0474] (S)-N-((R)-1-(1-벤질-3-(2,5-디플루오로페닐)-1H-1,2,4-트리아졸-5-일)-2,2-디메틸프로필)-N-(((3R,4R)-4-플루오로피롤리딘-3-일)메틸)-2-히드록시프로판아미드



[0475]

[0476] 절차

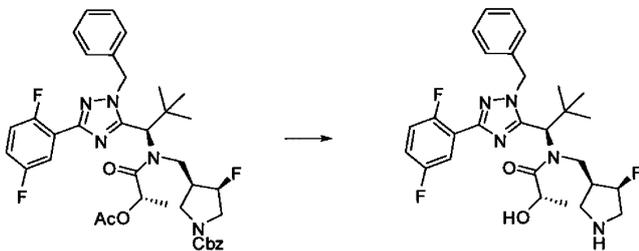
[0477] 아미드 결합 형성



[0478]

[0479] 디클로로메탄 중 (3R,4R)-벤질 3-(((R)-1-(1-벤질-3-(2,5-디플루오로페닐)-1H-1,2,4-트리아졸-5-일)-2,2-디메틸프로필아미노)메틸)-4-플루오로피롤리딘-1-카르복실레이트 (1.5 g, 2.53 mmol)의 용액 (25 ml, 0.1 M 용액)에 트리에틸아민 (458 μ l, 3.29 mmol)을 실온에서 첨가하였다. 이어서, (S)-1-클로로-1-옥소프로판-2-일 아세테이트 (416 μ l, 3.29 mmol)를 2분에 걸쳐 적가하였다. 생성된 용액을 실온에서 밤새 교반하였다. 반응 혼합물을 H₂O로 킨칭하고, EtOAc로 추출하였다. 유기층을 무수 나트륨 술페이트 상에서 건조시키고, 여과하였다. 휘발성 유기 물질을 진공하에 제거한 후, 목적하는 (3R,4R)-벤질 3-(((S)-2-아세톡시-N-((R)-1-(1-벤질-3-(2,5-디플루오로페닐)-1H-1,2,4-트리아졸-5-일)-2,2-디메틸프로필)-프로판아미도)메틸)-4-플루오로피롤리딘-1-카르복실레이트를 플래쉬 컬럼 크로마토그래피 (0% → 100%, 헥산 중 EtOAc) 상에서 정제하였다. LC/MS (uplc): MH⁺ 706.5, 1.34분.

[0480] 전반적인 탈보호



[0481]

[0482] 탈기된 EtOAc 중 (3R,4R)-벤질 3-(((S)-2-아세톡시-N-((R)-1-(1-벤질-3-(2,5-디플루오로페닐)-1H-1,2,4-트리아졸-5-일)-2,2-디메틸프로필)프로판아미도)메틸)-4-플루오로피롤리딘-1-카르복실레이트 (1.78 g, 2.53 mmol)의 용액 (25 ml, 0.1 M 용액)에 Pd/C (178 mg, 10 wt%)를 무수 N₂ 분위기하에 첨가하였다. 수소 기체로 플라싱한 후, 수소 기체 별분을 구비한 반응 혼합물을 실온에서 밤새 교반하였다. 반응 혼합물을 셀라이트® 패드를 통해 여과하고, EtOAc로 세척하였다. 휘발성 유기 여과물을 진공하에 제거하여, 조 아민을 수득하였다 (LC/MS (uplc): MH⁺ 572.4, 1.11분). 이어서, 조 생성물을 MeOH (168 ml, 0.015 M 용액) 중에 용해시키는 것에 이어서, 무수 탄산칼륨 (3.5 g, 25 mmol)을 첨가하였다. 이어서, 반응물을 실온에서 15분 동안 교반하였다. 백색 침전물을 여과에 의해 제거한 후, 유기 여과물을 진공하에 농축시켰다. 조 생성물을 분취용 역상 HPLC로 정제하였다. 생성물의 합한 분획물을 포화 NaHCO₃ 용액으로 중화시킨 다음, EtOAc (200 ml)로 추출하였다. 유기층을 무수 나트륨 술페이트 상에서 건조시키고, 여과하고, 진공하에 농축시켰다. 이어서, 건조된 생성물을 아세트니트릴 및 물 (1:1 비율) 중에 용해시키고, 48 h 동안 동결건조시켰다. 백색 분말성 (S)-N-((R)-1-(1-벤질-3-(2,5-디플루오로페닐)-1H-1,2,4-트리아졸-5-일)-2,2-디메틸프로필)-N-(((3S,4R)-4-플루오로피롤리딘-3-일)메틸)-2-히드록시프로판아미드를 유리 아민으로서 65.5% 수율 (876 mg, 3 단계에 걸침)로 수득하였다.

¹H NMR (CD₃Cl, 400 MHz): δ 7.82 (1H, m),

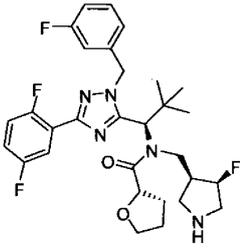
7.52 (2H, m), 7.34-7.25 (3H, m), 7.16 (1H, m), 7.07 (1H, m), 6.09 (1H, s), 5.44 (2H, s), 4.61 (2H, m), 4.39 (1H, m), 3.78 (1H, m), 3.60 (1H, m), 2.92 (1H, m), 2.56 (1H, m), 2.16 (2H, m), 1.44 (3H, m), 1.22 (1H, m), 0.99 (9H, s), 0.42 (1H, m). LC/MS

(uplc): MH⁺ 530.3, 1.05 분.

[0483]

[0484] 실시예 5

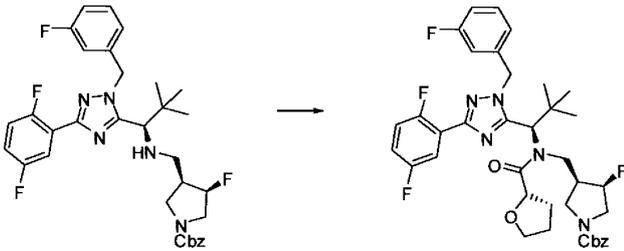
[0485] (S)-N-((R)-1-(3-(2,5-디플루오로페닐)-1-(3-플루오로벤질)-1H-1,2,4-트리아졸-5-일)-2,2-디메틸프로필)-N-(((3R,4R)-4-플루오로피롤리딘-3-일)메틸)테트라히드로푸란-2-카르복사미드



[0486]

[0487] 절차

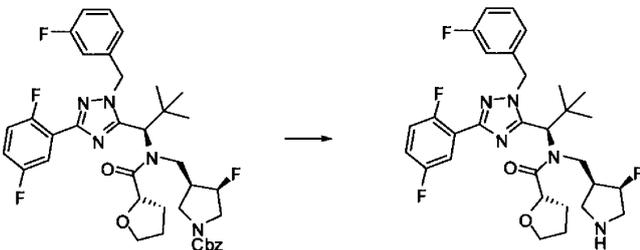
[0488] 아미드 결합 형성



[0489]

[0490] 디클로로메탄 중 (3R,4R)-벤질 3-(((R)-1-(3-(2,5-디플루오로페닐)-1-(3-플루오로벤질)-1H-1,2,4-트리아졸-5-일)-2,2-디메틸프로필아미노)메틸)-4-플루오로피롤리딘-1-카르복실레이트 (500 mg, 0.82 mmol)의 용액 (4 ml, 0.2 M 용액)에 트리에틸아민 (229 μ l, 1.64 mmol)을 실온에서 첨가하였다. 이어서, 조 (S)-테트라히드로푸란-2-카르보닐 클로라이드 (221 mg, 1.64 mmol)를 2분에 걸쳐 적가하였다. 생성된 용액을 실온에서 밤새 교반하였다. 반응 혼합물을 H₂O로 켄칭하고, EtOAc로 추출하였다. 유기층을 무수 나트륨 황산염 상에서 건조시키고, 여과하였다. 휘발성 유기 물질을 진공하에 제거한 후, 목적하는 (3R,4R)-벤질 3-(((S)-N-((R)-1-(3-(2,5-디플루오로페닐)-1-(3-플루오로벤질)-1H-1,2,4-트리아졸-5-일)-2,2-디메틸프로필)테트라히드로푸란-2-카르복사미도)메틸)-4-플루오로피롤리딘-1-카르복실레이트를 플래쉬 컬럼 크로마토그래피 상에서 정제하였다 (수율 N/A; 0 % \rightarrow 100%, 헥산 중 EtOAc). LC/MS (uplc): MH⁺ 708.4, 1.35분.

[0491] 탈보호



[0492]

[0493] 탈기된 EtOAc 중 (3R,4R)-벤질 3-(((S)-N-((R)-1-(3-(2,5-디플루오로페닐)-1-(3-플루오로벤질)-1H-1,2,4-트리아졸-5-일)-2,2-디메틸프로필)테트라히드로푸란-2-카르복사미도)메틸)-4-플루오로피롤리딘-1-카르복실레이트 (580 mg, 0.82 mmol)의 용액 (80 ml, 0.1 M 용액)에 Pd/C (873 mg, 10 wt%)를 무수 N₂ 분위기하에 첨가하였다. 수소 기체로 플러싱한 후, 수소 기체 별론을 구비한 반응 혼합물을 실온에서 밤새 교반하였다. 반응 혼합물을 셀라이트[®] 패드를 통해 여과하고, EtOAc로 세척하였다. 휘발성 유기 여과물을 진공하에 제거하여 조 생성물을 수득하고, 이를 분취용 역상 HPLC로 정제하였다. 생성물의 합한 분획물을 포화 NaHCO₃ 용액으로 중화시킨 다음, EtOAc로 추출하였다. 유기층을 무수 나트륨 황산염 상에서 건조시키고, 여과하고, 진공하에 농축하였다. 이어서, 건조된 생성물을 아세트니트릴 및 물 (1:1 비율) 중에 용해시키고, 48 h 동안 동결건조시켰다. 백색 분말성 (S)-N-((R)-1-(3-(2,5-디플루오로페닐)-1-(3-플루오로벤질)-1H-1,2,4-트리아졸-5-일)-2,2-디메틸프로필)-N-(((3S,4R)-4-플루오로피롤리딘-3-일)메틸)테트라히드로푸란-2-카르복사미드를 유리 아민

으로서 10.4% 수율 (48.9 mg)로 수득하였다.

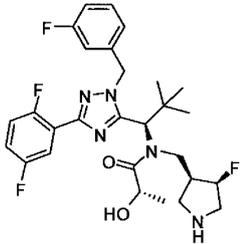
¹H NMR

(CD₃Cl, 400 MHz): δ 7.82 (1H, m), 7.34-7.25 (3H, m), 7.22 (1H, m), 7.15 (1H, m), 7.07 (1H, m), 6.98 (1H, m), 6.10 (1H, s), 5.44 (2H, m), 4.86 (2H, m), 4.19 (1H, m), 3.96 (1H, m), 3.86 (2H, m), 3.05 (1H, m), 3.05 (1H, m), 2.37-1.70 (2H, m), 1.35-1.02 (5H, m), 0.99 (9H, s). LC/MS (uplc): MH⁺ 574.4, 0.98 분.

[0494]

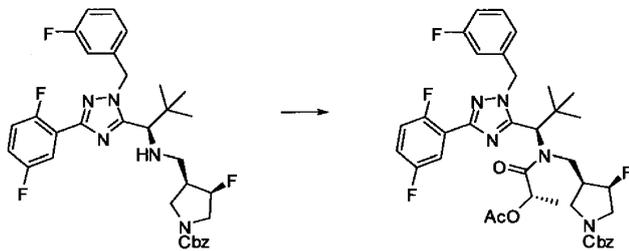
[0495] 실시예 6

[0496] (S)-N-((R)-1-(3-(2,5-디플루오로페닐)-1-(3-플루오로벤질)-1H-1,2,4-트리아졸-5-일)-2,2-디메틸프로필)-N-(((3R,4R)-4-플루오로피롤리딘-3-일)메틸)-2-히드록시프로판아미드



[0497]

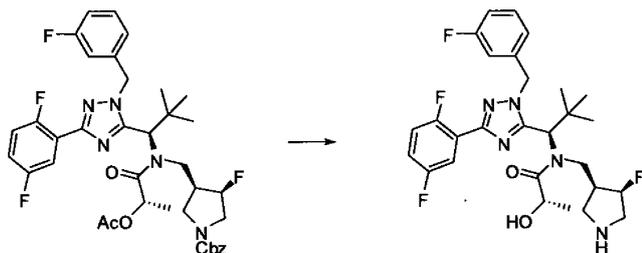
[0498] 아마이드 결합 형성



[0499]

[0500] 디클로로메탄 중 (3R,4R)-벤질 3-(((R)-1-(3-(2,5-디플루오로페닐)-1-(3-플루오로벤질)-1H-1,2,4-트리아졸-5-일)-2,2-디메틸프로필아미노)메틸)-4-플루오로피롤리딘-1-카르복실레이트 (1.48 g, 2.43 mmol)의 용액 (25 ml, 0.1 M 용액)에 트리에틸아민 (440 μ l, 3.16 mmol)을 실온에서 첨가하였다. 이어서, (S)-1-클로로-1-옥소프로판-2-일 아세테이트 (400 μ l, 3.16 mmol)를 2분에 걸쳐 적가하였다. 생성된 용액을 실온에서 밤새 교반하였다. 반응 혼합물을 H₂O로 쉐킹하고, EtOAc로 추출하였다. 유기층을 무수 나트륨 술페이트 상에서 건조시키고, 여과하였다. 휘발성 유기 물질을 진공하에 제거한 후, 목적하는 (3R,4R)-벤질 3-(((S)-2-아세톡시-N-((R)-1-(3-(2,5-디플루오로페닐)-1-(3-플루오로벤질)-1H-1,2,4-트리아졸-5-일)-2,2-디메틸프로필)프로판아미도)메틸)-4-플루오로피롤리딘-1-카르복실레이트를 플래쉬 컬럼 크로마토그래피 (0% \rightarrow 100%, 헥산 중 EtOAc)로 정제하였다. LC/MS (uplc) MH⁺ 724.4, 1.34분.

[0501] 전반적인 탈보호



[0502]

[0503] 탈기된 EtOAc 중 (3R,4R)-벤질 3-(((S)-2-아세톡시-N-((R)-1-(3-(2,5-디플루오로페닐)-1-(3-플루오로벤질)-1H-1,2,4-트리아졸-5-일)-2,2-디메틸프로필)프로판아미도)메틸)-4-플루오로피롤리딘-1-카르복실레이트 (2.24 g, 3.09 mmol)의 용액 (25 ml, 0.1 M 용액)에 Pd/C (224 mg, 10 wt%)를 무수 N₂ 분위기하에 첨가하였다. 수소 기

체로 플로싱한 후, 수소 기체 별분을 구비한 반응 혼합물을 실온에서 밤새 교반하였다. 반응 혼합물을 셀라이트® 패드를 통해 여과하고, EtOAc로 세척하였다. 휘발성 유기 여과물을 진공하에 제거하여, 조 아민을 수득하였다. 이어서, 조 생성물을 MeOH (200 ml, 0.015 M 용액) 중에 용해시키는 것에 이어서, 무수 탄산칼륨 (4.2 g, 30.9 mmol)을 첨가하였다. 이어서, 반응물을 실온에서 15분 동안 교반하였다. 백색 침전물을 여과에 의해 제거한 후, 유기 여과물을 진공하에 농축하였다. 조 생성물을 분취용 역상 HPLC로 정제하였다. 생성물의 합한 분획물을 포화 NaHCO₃ 용액으로 중화시킨 다음, EtOAc (200 ml)로 추출하였다. 유기층을 무수 나트륨 술페이트 상에서 건조시키고, 여과하고, 진공하에 농축하였다. 이어서, 건조된 생성물을 아세트니트릴 및 물 (1:1 비율) 중에 용해시키고, 48 h 동안 동결건조시켰다. 백색 분말성 (S)-N-((R)-1-(3-(2,5-디플루오로페닐)-1-(3-플루오로벤질)-1H-1,2,4-트리아졸-5-일)-2,2-디메틸프로필)-N-(((3S,4R)-4-플루오로피롤리딘-3-일)메틸)-2-히드록시프로판아미드를 유리 아민으로서 57% 수율 (962 mg, 3 단계에 걸침)로 수득하였다.

¹H NMR (CD₃OD,

400 MHz): δ 7.81 (1H, m), 7.40-7.16 (5H, m), 7.06 (1H, m), 6.12 (1H, s), 5.44 (2H, m), 4.77 (2H, m), 3.87 (1H, m), 2.82 (2H, m), 2.28 (1H, m), 2.17 (1H, m), 1.95 (1H, m), 1.43 (3H, m), 1.22 (1H, m), 0.91 (9H, s). LC/MS (uplc): MH⁺ 548.3, 0.94 분.

[0504]

[0505] **실시예 7**

[0506] **KSP 활성 측정을 위한 분석법**

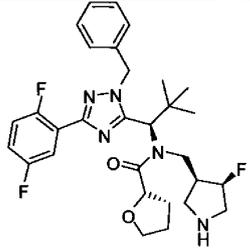
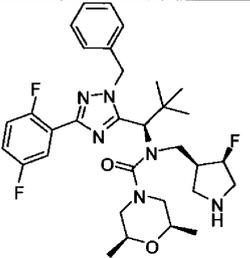
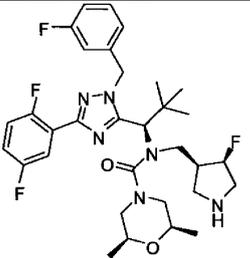
[0507] 본 실시예는 시험관내 KSP 활성의 측정을 위한 대표적인 시험관내 분석법을 제공한다. 소 뇌로부터 얻어진 정제된 미세소관을 사이토스켈레톤 인크.(Cytoskeleton Inc.) (미국 콜로라도주 덴버 소재)로부터 구입하였다. 인간 KSP (Eg 5, KNSL1)의 모터 도메인을 95% 초과와 상동성으로 클로닝하고, 발현시키고 정제하였다. 바이오몰 그린(Biomol Green)은 바이오몰 인터내셔널 엘.피.(BIOMOL International L.P.) (미국 펜실베이니아주 플리머스 미팅 소재)로부터 구입하였다. 미세소관을 37°C에서 10분 동안 신속하게 해동한 후, 희석시켰다. 미세소관 및 KSP 모터 단백질 (즉, KSP 모터 도메인)을 분석 완충액 (20 mM 트리스-HCl (pH 7.5), 1 mM MgCl₂, 10 mM DTT 및 0.125% BSA) 중에 최종 농도 50 μ g/mL 미세소관 및 3 nM KSP로 희석시켰다.

[0508] 1.25 μ l의 억제제 또는 DMSO 중 시험 화합물 (또는 대조군의 경우 DMSO만)을 함유한 시험 플레이트 (96-웰 절반영역 플레이트)의 각각의 웰에 25 μ l의 ATP 용액 (분석 완충액 중 250 μ M의 농도로 희석된 ATP) 및 25 μ l의 상기 기재된 미세소관/KSP 용액을 첨가하였다. 플레이트를 실온에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션에 이어, 0.015% 트윈(Tween) 20을 포함하는 65 μ l의 바이오몰 그린 (무기 포스페이트의 방출을 검출하는 말라카이트 그린-기재의 염료)을 각각의 웰에 첨가하였다. 플레이트를 추가로 15 내지 20분 동안 인큐베이션한 다음, 650 nm에서의 흡광도를 몰레큘러 디바이시스(Molecular Devices) 분광광도계를 이용하여 측정하였다. 650 nm에서의 흡광도의 양은 샘플에서의 KSP 활성의 양에 상응한다. 이어서, 각각의 억제제 또는 시험 화합물의 IC₅₀을, 엑셀(Excel)용 XLFit 또는 프리즘(Prism) 데이터 분석 소프트웨어를 이용하여 그래프패드 소프트웨어 인크.(GraphPad Software Inc.)에 의해 비선형 회귀를 통해, 각각의 농도에 대한 650 nm에서의 흡광도 감소를 기준으로 측정하였다.

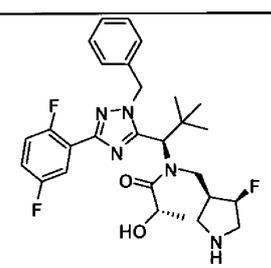
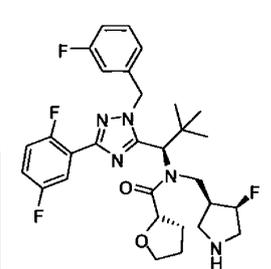
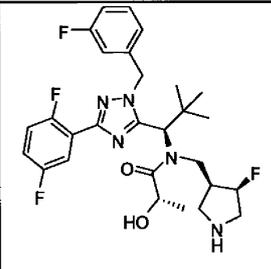
[0509] 바람직한 본 발명의 화합물은 실시예 7에 기재된 분석 프로토콜에서 약 1 mM 미만의 IC₅₀에 의해 측정된 바와 같은 생물학적 활성을 갖고, 바람직한 실시양태에서는 약 25 μ M 미만의 생물학적 활성을 갖고, 특히 바람직한 실시양태에서는 약 1000 nM 미만의 생물학적 활성을 갖고, 가장 바람직한 실시양태에서는 약 100 nM 미만의 생물학적 활성을 갖는다.

[0510] 표 1은 본 발명을 대표하는 예시적 실시예에 대한 구조식, IC₅₀ 값, 질량 분석 데이터 및 체류 시간을 열거한다.

[0511] <표 1>

화합물 번호	구조식	생물학적 활성 (IC50)	체류 시간 (분)	질량 (MH ⁺)	방법
1		0.96 nM	0.99	556.4	LC/MS (uplc)
2		0.83 nM	1.06	599.5	LC/MS (uplc)
3		0.74 nM	1.06	617.5	LC/MS (uplc)

[0512]

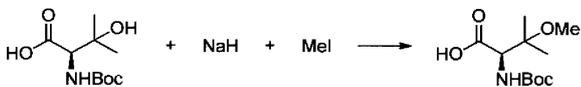
화합물 번호	구조식	생물학적 활성 (IC50)	체류 시간 (분)	질량 (MH ⁺)	방법
4		0.60 nM	1.05	530.3	LC/MS (uplc)
5		1.46 nM	0.98	574.4	LC/MS (uplc)
6		0.83 nM	0.94	548.3	LC/MS (uplc)

[0513]

[0514] 본 발명의 추가적인 화합물은 하기 표 2에 있다. 이들 화합물은 상기 기재된 바와 유사하게 제조되었으며, R¹에 알콕시기가 혼입되었다. 이들 화합물의 알콕시-함유 부분은 하기 실시예에 예시된 바와 같이 제조될 수 있다.

[0515] **실시예 9**

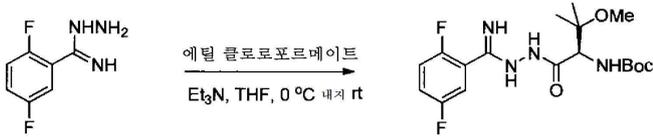
[0516] (R)-2-((tert-부톡시카르보닐)아미노)-3-히드록시-3-메틸부탄산의 메틸화



[0517]

[0518] 무수 THF (60 ml) 중의 미네랄 오일 중 수소화나트륨 현탁액 (60%wt) (3.86 g, 96 mmol)의 용액에 THF (50 ml) 중 (R)-2-((tert-부톡시카르보닐)아미노)-3-히드록시-3-메틸부탄산 (7.5 g, 32.2 mmol)을 0°C에서 서서히 첨가하였다. 실온에서 1 h 동안 교반한 후, 요오드메탄 (4.31 ml, 38.6 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 밤새 교반하였다. 물로 켄칭한 후, 반응 혼합물을 에테르에 의해 추출하였다. 6 N HCl을 첨가하여 수성층을 pH = 3으로 산성화한 후, EtOAc로 추출하였다. 유기층을 염수로 세척하고, 무수 Na₂SO₄ 상에서 건조시키고, 뷰흐너(Buchner) 깔때기를 통해 여과하고, 농축하여, 조 (R)-2-((tert-부톡시카르보닐)아미노)-3-메톡시-3-메틸부탄산 (7 g, 28.3 mmol, 88%)을 수득하고, 이를 정제 없이 다음 단계에서 사용하였다. LC/MS (uplc): MH⁺ 160.1, 0.68분.

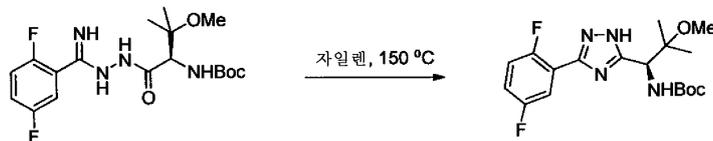
[0519] 2,5-디플루오로벤즈이미도히드라지드의 아실화



[0520]

[0521] 조 (R)-2-((tert-부톡시카르보닐)아미노)-3-메톡시-3-메틸부탄산 (4 g, 16.2 mmol)을, 무수 THF (32.4 ml, 0.5 M) 중 Et₃N (3.38 ml, 24.26 mmol), 에틸 클로로포르메이트 (1.931 g, 17.79 mmol)를 -5℃ 내지 0℃에서 첨가함으로써, 혼합된 무수물로 전환시켰다. 혼합물을 -5℃에서 30분 동안 교반하였다. 생성된 고체를 여과해 내고, 추가의 무수 THF를 첨가하여 침전물을 세척하였다. 이어서, 생성된 반응 용액을 -5℃에서 2,5-디플루오로벤즈이미도-히드라지드 (2.77 g, 16.18 mmol)의 THF 용액에 첨가하였다. 이어서, 반응물을 실온으로 점차적으로 가온하고, 밤새 교반하였다. 일단 반응이 완료되면, 혼합물을 EtOAc 및 H₂O 사이에 분배하였다. 유기층을 분리하고, H₂O, 염수로 세척한 다음, 무수 Na₂SO₄ 상에서 건조시키고, 여과하고, 감압하에 증발시켜 조 생성물을 수득하고, 이를 실리카 겔 컬럼 (헥산 중 50% EtOAc) 상에서 정제하여, (R)-tert-부틸 1-(2-((2,5-디플루오로페닐)(이미노)메틸)히드라지닐)-3-메톡시-3-메틸-1-옥소부탄-2-일)카르바메이트 (1g, 15%)를 수득하였다. LC/MS (uplc): MH⁺ 401.2, 0.61분.

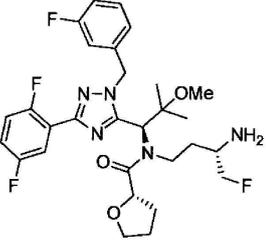
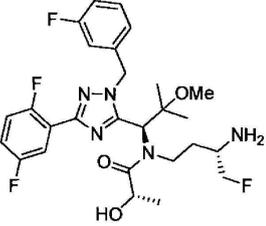
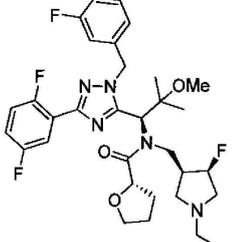
[0522] (S)-tert-부틸 1-(3-(2,5-디플루오로페닐)-1H-1,2,4-트리아졸-5-일)-2-메톡시-2-메틸프로필)카르바메이트의 합성



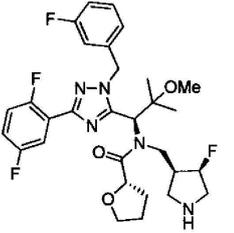
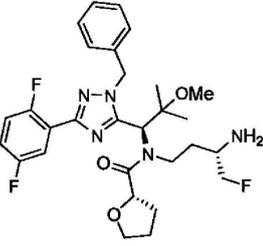
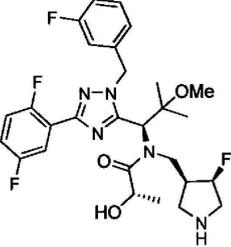
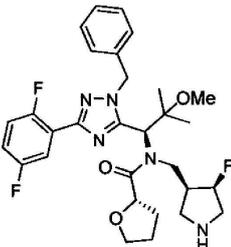
[0523]

[0524] (R)-tert-부틸 1-(2-((2,5-디플루오로페닐)(이미노)메틸)히드라지닐)-3,3-디메틸-1-옥소부탄-2-일)카르바메이트 (1.0 g, 2.497 mmol)를 자일렌 (8 ml) 중에 용해시켰다. 단-스타크 트랩을 구비하고, 반응 혼합물을 160℃로 가열하였다. 일단 반응이 완료되면, 혼합물을 실온으로 냉각되도록 한 다음, EtOAc 및 포화 NaHCO₃ 수용액 사이에 분배하였다. 유기층을 분리한 다음, 포화 NaHCO₃ 수용액, H₂O 및 염수로 세척하는 것에 이어서, Na₂SO₄ 상에서 건조시키고, 여과하고, 감압하에 증발시켜, (S)-tert-부틸 1-(3-(2,5-디플루오로페닐)-1H-1,2,4-트리아졸-5-일)-2-메톡시-2-메틸프로필)카르바메이트 (0.97 g, 98%)를 수득하고, 이를 추가 정제 없이 다음 단계에 사용하였다. LC/MS (uplc): MH⁺ 383.2, 0.9분.

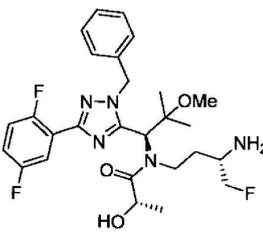
[0525] <표 2>

화합물 번호	분자 구조식	KSP IC50 (μ M)	LCMS/ Rt (분)	MH+
7		0.00123	0.86	578.2
8		0.00149	0.82	552.3
9		0.04941	0.92	618.3

[0526]

화합물 번호	분자 구조식	KSP IC50 (uM)	LCMS / Rt (분)	MH+
10		0.0009	0.88	590.2
11		0.0014	0.86	560.4
12		0.00087	0.85	564.4
13		0.00069	0.89	572.4

[0527]

화합물 번호	분자 구조식	KSP IC50 (uM)	LCMS / Rt (분)	MH+
14		0.00234	0.82	534.4

[0528]

[0529] 이러한 유형의 대표적 화합물에 대한 NMR 데이터는 하기에 제공된다:

화합물 번호	¹ H NMR 데이터
7	¹ H NMR (CD ₃ OD, 400 MHz) δ 7.87 - 7.73 (m, 1H), 7.45 - 7.31 (m, 1H), 7.32 - 7.11 (m, 4H), 7.11 - 6.95 (m, 1H), 6.2 (s, 1H), 5.61 - 5.29 (m, 2H), 4.81 - 4.69 (m, 1H), 4.51 - 4.3 (m, 1H), 4.29 - 3.97 (m, 3H), 3.95 - 3.80 (m, 1H), 3.75 - 3.61 (m, 1H), 3.16 (s, 3H), 2.38 - 2.21 (m, 1H), 2.17 - 1.81 (m, 3H), 1.80 - 1.66 (m, 1H), 1.26 - 1.16 (m, 1H), 1.15 (s, 3H), 1.05 (s, 3H), 0.94 - 0.73 (m, 1H)
8	¹ H NMR (CD ₃ OD, 400 MHz) δ 7.85 - 7.71 (m, 1H), 7.45 - 7.32 (m, 1H), 7.31 - 7.14 (m, 4H), 7.11 - 7.00 (m, 1H), 6.2 (s, 1H), 5.63 - 5.34 (m, 2H), 5.6 - 5.3 (m, 2H), 4.62 - 4.40 (m, 2H), 4.38 - 4.23 (m, 1H), 4.21 - 3.98 (m, 2H), 3.69 - 3.55 (m, 1H), 3.23 - 3.09 (m, 3H), 2.05 - 1.94 (m, 1H), 1.76 - 1.56 (m, 1H), 1.50 - 1.37 (m, 1H), 1.26 - 1.15 (m, 2H), 1.14 (s, 3H), 1.03 (s, 3H), 0.90 - 0.74 (m, 1H)
10	¹ H NMR (CD ₃ OD, 400 MHz) δ 7.8 (m, 1H), 7.4 (m, 1H), 7.34 - 7.14 (m, 4H), 7.09 (m, 1H), 6.2 (s, 1H), 5.67 - 5.39 (m, 2H), 4.78 (m, 1H), 4.36 - 3.99 (m, 3H), 3.99 - 3.80 (m, 1H), 3.55 - 3.37 (m, 1H), 3.38 - 3.32 (m, 1H), 3.12 (s, 3H), 2.87 - 2.69 (m, 1H), 2.55 - 2.22 (m, 2H), 2.22 - 2.04 (m, 2H), 2.04 - 1.79 (m, 2H), 1.46 - 1.31 (m, 1H), 1.28 - 1.10 (m, 4H), 1.10 - 0.93 (m, 3H)
14	¹ H NMR (CD ₃ Cl, 400 MHz): δ 7.80 - 7.68 (m, 1H), 7.4-7.26 (s, 4H), 7.22 - 6.97 (m, 3H), 6.10 - 5.97 (s, 1H), 5.56 - 5.25 (m, 2H), 4.68 (m, 1H), 4.30 - 3.89 (m, 3H), 3.86 - 3.51 (m, 1H), 3.2-3.1 (m, 1H), 3.07 (s, 3H), 1.58 - 1.43 (m, 2H), 1.35 (d, 3H), 1.25 (m, 1H), 1.05 (s, 3H), 0.94 (s, 3H), 0.5 (m, 1H)

[0530]

[0531] **실시예 8**

[0532] **KSP 억제제로 처리된 종양 세포주에서의 세포 증식 억제**

[0533] 세포를 96-웰 플레이트의 각 웰 당 약 500개 세포의 밀도로 96-웰 플레이트에 플레이트팅하고, 24시간 동안 성장시켰다. 이어서, 상기 세포를 다양한 농도의 화합물로 72시간 동안 처리하였다. 이어서, 셀타이터-글로 (CellTiter-Glo)[®] 용액 100 μl를 첨가하였다. 셀타이터-글로[®] 분석법은 세포 용해 후 웰에 존재하는 ATP의 양을 측정하고, 방출된 ATP는 효소 루시페라제 및 그의 기질 루시페린을 포함하는 효소 반응에 사용된다. 발광량은 ATP의 양에 비례하며, 그 결과 웰 내 생존하는 세포의 수에 비례한다 (프로메가(Promega) 제품 카탈로그 #G7573 참조, 셀타이터-글로[®] 발광 세포 생존가능성 분석법). 이어서, 세포를 암실에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 발광량을 왈라 트리룩스(Wallac Trilux) 플레이트 판독기를 이용하여 각각의 웰에 대해 측정하였고, 이것은 웰 당 세포수와 관련된다. DMSO (0.5%) 만을 처리한 웰에서의 생존 세포의 수는 0% 억제의 지표로서 작용하며, 세포가 없는 웰은 세포 성장의 100% 억제로서 작용하였다. 50% 성장 억제 (GI₅₀)를 생성하는 화합물 농도는 연속적인 화합물 노출 72시간에 로그-전환된 용량값 대 세포수 (대조군에 대한 백분율)의 S자형 용량-반응 곡선으로부터 그래프적으로 측정되었다.

[0534] 사용된 세포주는 하기 열거되어 있다.

[0535] 세포 증식 분석법은 상기 기재된 바와 같이 수행하였다.

[0536] 암 세포주

[0537] Colo 205 - 결장 암종

[0538] RPMI 1640 + 10% FBS + 1% L-글루타민 + 1% P/S + 1% NaPyr.+

[0539] Hepes + 4.5 g/L 글루코스 + 1% NaBicarb.

[0540] MDA 435 - 유방 암- 높은 met

[0541] EMEM + 10% FBS + 1% P/S + 1% L-글루타민 + 1% NEAA +

[0542] 1% NaPyr + 1% 비타민

[0543] HCT-15 및 HCT116 - 결장 암종

[0544] RPMI 1640 + 10 % FBS + 1% L-글루타민 + 1% P/S

- [0545] 약물 내성 세포주
- [0546] KB3.1 - 결장 상피 암종; 모 세포주
- [0547] 이스코브스(Iscove's) + 10% FBS + 1% L-글루타민 + 1% P/S
- [0548] KBV1 - p-글리코단백질과 연관된 다중-약물 내성 세포주
- [0549] RPMI 1640 + 10% FBS + 1% L-글루타민 + 1% P/S +
- [0550] 0.2 ug/mL 빈블라스틴
- [0551] KB8.5 - p-글리코단백질과 연관된 다중-약물 내성 세포주
- [0552] DMEM + 10% FBS + 1% L-글루타민 + 1% P/S + 10 ng/mL 콜히친
- [0553] 바람직한 본 발명의 화합물은 상기 기재된 분석 프로토콜에서 약 1 mM 미만의 GI₅₀에 의해 측정된 바와 같은 생물학적 활성을 갖고, 일부 실시양태에서는 약 25 μM 미만의 생물학적 활성을 갖고, 다른 실시양태에서는 약 1000 nM 미만의 생물학적 활성을 갖고, 또다른 실시양태에서는 약 100 nM 미만의 GI₅₀을 갖는다.
- [0554] **실시예 9**
- [0555] **콜로니형성 연질 한천 분석 프로토콜**
- [0556] 인간 암 세포를 6-웰 플레이트에 웰 당 3×10^5 개 세포의 밀도로 플레이팅하였다. 다음 날, 특정 농도의 관심 화합물을 각각의 웰에 첨가하였다. 24 및 48시간 인큐베이션 후에, 세포를 수확하고, 세척하고 카운팅하였다. 이후 단계는 멀티텍(Multitek) 96 로봇을 이용하여 수행하였다. 이어서, 웰 당 500개의 생존 세포를 96-웰 플레이트 (폴리헤마(PolyHema)로 코팅하여 세포가 웰 바닥에 부착되는 것을 방지함)에 플레이팅하였다. 아가로스 (3% 원액)를 용융시키고, 따뜻한 배지에 희석시키고, 최종 농도 0.5%로 세포에 첨가하였다. 연질 한천을 고형화시킨 후에, 플레이트를 6일 동안 37°C에서 인큐베이션하였다. 알라머 블루(Alamar blue) 염료를 첨가하고, 플레이트를 추가 6시간 동안 인큐베이션하였다. 광학 밀도 변화를 플레이트 판독기 상에서 측정하였고, 이것은 연질 한천에서 형성된 콜로니 수와 상호연관된 것으로 여겨진다. 암성 세포는 한천 상에서 성장할 수 있고, 따라서 광학 밀도의 증가를 나타낼 것이다. 감소된 광학 밀도가 판독되는 것은 암 세포가 억제된 것을 의미한다. 본 발명의 화합물이 광학 밀도의 감소를 나타낼 것으로 예상된다.